

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR CHIRURGIE

DIREKTOR: PROF. DR. MED. HANS JÜRGEN SCHLITT

LEITER EXPERIMENTELLE CHIRURGIE: PROF. DR. EDWARD K. GEISSLER, PHD

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Effekte von Elicitin auf Wachstum, Proliferation und Signaltransduktion von Tumorzellen *in vitro*

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Medizinischen Fakultät
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Felix Mross

2012

Dekan:	Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Edward K. Geissler, PhD
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Wolfgang Oßwald, PhD
Tag der mündlichen Prüfung:	17.12.2012

1. EINLEITUNG	8
1.1 Krebs: Epidemiologie, Entstehung und Bekämpfung	8
1.2 Zytotoxische Eigenschaften verschiedener Phytophthora-Pathogene.....	11
1.3 Elicitine, spezifische Peptide der Phytophthora.....	12
1.3.1 Wirkung von Elicitinen.....	13
1.3.2 Spezifische Rezeptoren und MAP-Kinase-Kaskade.....	14
1.3.3 Elicitin induzierte Signaltransduktion	15
1.3.3.1 Ionenfluss über Membranen	15
1.3.3.2 Oxidative burst (O_2^- , H_2O_2) und Zelltod	15
1.3.4 Weitere Elicitinwirkungen	16
1.3.4.1 Steroltransport.....	16
1.3.4.2 Mikrotubulizerstörung.....	17
1.4 Elicitine als mögliche Antitumorpeptide.....	17
1.4.1 Allgemeines	17
1.4.2 ROS	17
1.4.3 Mikrotubulidestruktion	19
1.4.4 Vergleichbare Signalkaskaden (MAP-Kinasen; Bildung von ROS)	19
1.4.4 Spezifische Fragestellung.....	22
2.1 Gewinnung und Isolation der Elicitine	23
2.1.1 Elicitine aus einem aktiven <i>P. quercina</i> und <i>P. citricola</i> Isolat.....	23
2.1.2 Elicitine aus einem für zwei Jahre in der Mykothek gelagerten <i>P. quercina</i> Isolat.....	23
2.1.2.1 Gemeinsame Aufreinigung der sauren und basischen Elicitine aus dem Kulturfiltrat von <i>Phytophthora quercina</i>	23
2.1.2.2 Aufreinigung von <i>P. quercina</i> Elicitinen bei verschiedenen pH-Werten	24
2.1.2.3 Aufreinigung der basischen Elicitine aus dem Kulturfiltrat von <i>P. quercina</i>	25
2.1.3 Aktivitätstest der gereinigten Elicitinfraktionen.....	25
2.2 Proteinquantifizierung mit BCA.....	26
2.3 Zellkultur	28

2.4 Wachstumskurve	29
2.4.1 Verdünnungsreihe	30
2.4.2 Ernten	30
2.5 MTT-Assay	31
2.6 H₂O₂-Assay	33
2.7 Western Blot	34
2.8 FACS-Analyse	40
2.8.1 CFSE – Färbung	40
2.8.2 7AAD-Apoptose-Assay	43
2.9 Datenanalyse	43
2.10 Verwendete Software:	44
 3. ERGEBNISSE	 45
3.1 Vorversuche zur Etablierung der MTT-Methode (Experiment 1)	45
3.2 Versuche mit Elicitinen aus einem aktiven <i>P. quercina</i> und <i>P. citricola</i> Isolat	47
3.2.1 B-16 Zellen, Experiment 2a	47
3.2.2. CT-26 Zellen, Experiment 2b und 2b'	49
3.2.3 TMK-1, Experiment 2c	51
3.2.4 Kreuztestung mit PBS, Experiment 3a	51
3.2.5 HUVECs, Experiment 3b	52
3.2.6 Keratinozyten, Experiment 3c	53
3.2.7 Zusammenfassung der Screeningexperimente	54
3.3 Versuche mit Elicitinen aus einem für zwei Jahre gelagerten <i>P. quercina</i> Isolat	55
3.3.1 Versuche mit Elicitinmischisolat (<u>saure und basische Elicitine</u>) aus einem Phytophthora quercina Kulturfiltrat	55
3.3.1.1 TMK-1, Experiment 4	55
3.3.1.2 Keratinozyten, Experiment 5	57
3.3.1.3 CT-26, Experimente 6 + 7	59
3.3.1.4 LLC-1, Experiment 8	63

3.3.1.5 Rückkehr zu B-16	65
3.3.1.5.1 Zellkultur, Experiment 9.....	65
3.3.1.5.2 Kreuztestung der BCA Reagenzien	68
3.3.1.5.3 H ₂ O ₂ -Messung, Experiment 10.....	69
3.3.1.5.4 Westernblots, Experiment 11	70
3.3.1.5.5 Diätexperimente	72
3.3.1.5.5.1 Diätstress vor Elicitingabe, Experiment 12a.....	72
3.3.1.5.5.2 Diätstress bei gleichzeitiger Elicitingabe, Experiment 12b.....	73
3.3.1.5.5.3 Diätexperiment mit aufsteigenden FCS Konzentrationen im Medium, Experiment 13 (entspricht El 19)	73
3.3.1.5.6 FACS-Analyse, Experiment 14 (entspricht El 20).....	75
3.3.1.5.6.1 CFSE, Experiment 14a.....	77
3.3.1.5.6.2 7AAD, Experiment 14b	77
3.3.2 Versuche mit <u>hauptsächlich basischen</u> Elicitinen aus einem Phytophthora quercina Kulturfiltrat unter Verwendung verschiedener Aufreinigungsarten und Kulturbedingungen.....	79
3.3.2.1 Versuche mit unterschiedlichem Aufreinigungsgrad (A bzw. A + K) und Oberflächen, Experiment 15	79
3.3.2.2 Versuche mit bei unterschiedlichen pH-Werten isolierten Elicitinen:	81
3.3.2.2.1 Experiment ohne Mediumwechsel, Experiment 16	82
3.3.2.2.2 Experiment mit Mediumwechsel und hoher Zelldichte, Experiment 17.....	83
3.3.2.2.3 Experiment mit niedrigen Quercininkonzentrationen, Experiment 18.....	84
3.3.2.3 Versuche mit unterschiedlicher Zelldichte (durch höhere Zelldichte bei Aussaat oder verlängerte Einwirkungszeit).....	85
3.3.2.3.1 Experiment 19	86
3.3.2.3.2 Experiment 20	87
3.3.2.3.3 Experiment 21	87
3.3.2.3.4 Experiment 22	88
3.3.2.4 Einfluss auf Adhäsionsverhalten, Experiment 23.....	89
3.3.2.5 Einfluss der Lyophilisation auf Elicitinaktivität, Experimente 24 und 24'	90
4. DISKUSSION.....	95

4.1 Allgemeiner Teil	95
4.2. Diskussion der Methoden	95
4.3 Diskussion der einzelnen Zelllinien.....	97
4.3.1 B16.....	97
4.3.2 CT-26.....	101
4.3.3 LLC-1	103
4.3.4 TMK-1	103
4.3.5 HUVECs	104
4.3.6 HEK	104
4.4 Zusammenfassender Vergleich der 4 Tumorzelllinien B-16, CT-26, TMK-1 und LLC-1 miteinander	105
4.4.1 Zellzahl	105
4.4.2 MTT.....	105
4.4.3 MTT/Einzelle	106
4.5 Fazit und Ausblick	107
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	111
6. LEBENSLAUF	113
7. DANKSAGUNG	115
8. MATERIALIEN	116
8.1 Substanzen und Zellkulturbedarf	116
8.2 Geräte	120
9. LITERATURVERZEICHNIS.....	122
10. ABBILDUNGS-VERZEICHNIS	130
11. TABELLEN-VERZEICHNIS	136
12. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	136

1. EINLEITUNG

1.1 KREBS: EPIDEMIOLOGIE, ENTSTEHUNG UND BEKÄMPFUNG

Jedes Jahr sterben unzählige Menschen an Krebs, laut WHO waren es allein im Jahr 2005 7,6 Millionen [1] Menschen. Ferner wurde alleine im Jahr 2004 bei 11,4 Millionen Menschen die Diagnose Krebs gestellt, wobei die Mehrzahl dieser Tumorerkrankungen in Ländern mit hohem Einkommen gezählt wird, und entsprechend auf die dort höhere Lebenserwartung zurückgeführt wird. Allein in Europa beträgt die jährliche Inzidenz für Tumorerkrankungen drei Millionen. Was WHO-Vorhersagen anbelangt wird Krebs in Zukunft die häufigste Todesursache noch vor ischämischen Herzerkrankungen, zerebrovaskulären Erkrankungen, infektiösen oder traumatischen Ursachen sein [2] und krebsbedingte Todesfälle werden auch in Zukunft trotz intensivster Forschung kontinuierlich weiter ansteigen wie in Abbildung 1 ersichtlich ist. Die häufigsten Krebsarten in den Industrienationen sind Lungenkrebs, gefolgt von Brustkrebs, Colon- bzw. Rektumkrebs, Magenkrebs und anderen bösartigen Neubildungen wie z.B. malignen Melanomen (Abbildung 2).

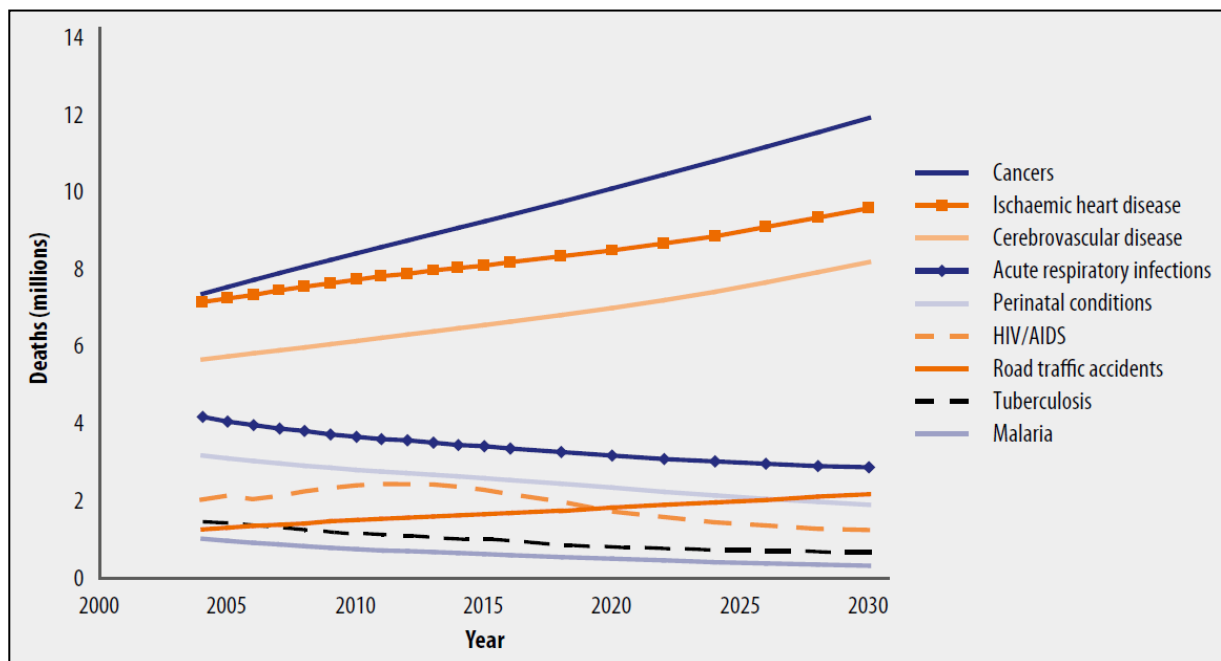


Abbildung 1 Weltweit erfasste Todesfälle in Millionen nach Ursachen geordnet. Die Anzahl der weltweiten krebsbedingten Tode steigt auch in Zukunft kontinuierlich an. Quelle: WHO, global burden of disease

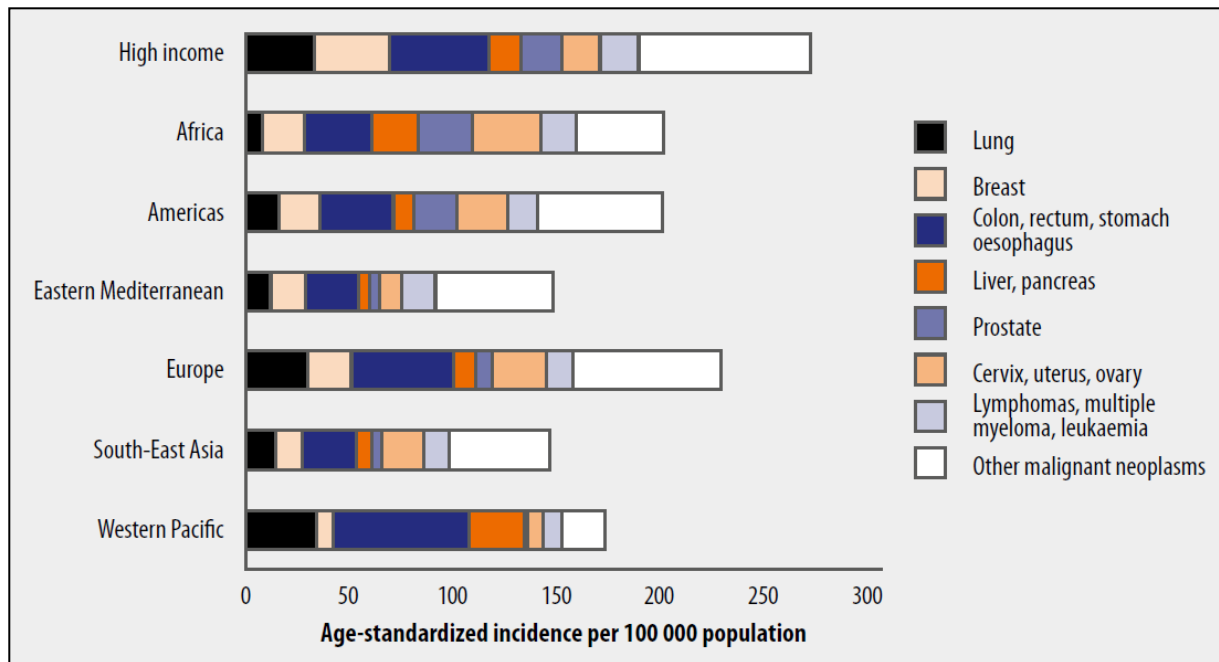


Abbildung 2 Verteilung der jährlichen Krebsneuerkrankungen nach Regionen geordnet. Quelle: WHO, global burden of disease

Bereits im Jahre 1914 wurde von T. Boveri dokumentiert, dass Tumorzellen ein gegenüber normalen Zellen verändertes Mitoseverhalten aufweisen und über ein abweichendes Chromosomenmuster verfügen, welches an die Tochtergenerationen weitergegeben werden kann [3]. Weiterführend postulierte K.H. Bauer 1928, dass die Tumorigenese durch somatische, karzinogeninduzierte Mutationen bedingt ist (Bauer 1928, zit nach [4]). Diese Transformation einer gesunden zur malignen Zelle kann allerdings nicht durch nur eine einzelne separate Mutation hervorgerufen werden. Es müssen vielmehr verschiedene genetische Veränderungen in den für den Zellzyklus essentiellen Schlüsselgenen stattfinden, welche für Signaltransduktion und Proliferation der Zellen verantwortlich sind, wie beispielsweise Mutationen in Tumorsuppressorgenen (wie p16, p53, p27 etc.) und Protoonkogenen (wie Transkriptionsfaktoren, Tyrosinrezeptorkinasen oder Wachstumsfaktoren etc.) [4; 5]. Laut Hanahan et al [6] kommt es durch diese genetischen Veränderungen sowohl zu Funktionsgewinnen (Aktive Signaltransduktion auch ohne exogenes Wachstumssignal) als auch zu Funktionsverlusten (Tumorsuppressorgene werden inaktiviert). In der Mitte des vorigen Jahrhunderts schuf Beerenblum die Grundlagen für das heutige Verständnis der Tumorentstehung als ein mehrstufiger Prozess [7; 8]. In mit Mäusen durchgeführten Experimenten stellte er die These auf, dass sich die Tumoren nur entwickeln, wenn verschiedene zelluläre Prozesse in gewisser Reihenfolge ablaufen. Genauer gesagt, geht man dabei von einem Modell, bestehend aus Initiation, Latenzzeit,

Promotion und Progression aus. Der irreversiblen Genom-Schädigung (=Initiation) folgte die sukzessive Vermehrung der initiierten Zellen (=Promotion), gefolgt von deren zunehmenden malignen Entartung (=Progression) [9]. Im normalen Zellzyklus befinden sich die Entstehung von DNA-Schäden sowie deren Reparatur im Gleichgewicht. Ist dieses Gleichgewicht nun beispielsweise durch Zellschädigung bzw. Zellalterung oder Exposition schädlicher Noxen gestört, ist eine maligne Entartung der Zelle möglich. Verschiedene biologische Phänomene sind dabei mit der Tumorentstehung in Verbindung gebracht, wie beispielsweise Sequenzmutationen [10], Mikrosatellitverschiebungen [11] und deren Instabilität [12], Loss-of-heterozygosity-Mutationen [13] und Karyotypveränderungen wie Chromosomenabberationen oder Aneuploidie [14; 15; 16; 17]. Darüber hinaus sind epigenetische Einflüsse auf die Tumorentstehung beschrieben [18; 19; 20]. Insgesamt geht man heute davon aus, dass in Tumoren in etwa 0,2 – 1 % der Zellen potentielle Stammzellen sind und die Fähigkeit zur Tumorigenese besitzen [21; 22]. Die maligne Transformation zu diesen Stammzellen kann dabei ursächlich bedingt sein durch exogene chemische, physikalische, bakterielle oder virale Einflüsse [23]. Neben diesen exogenen Faktoren spielen daneben auch familiäre Disposition (u.a. Hereditäres Brustkrebssyndrom, Ovar-CA, FAP), hormonelle Einflüsse (u.a. Uterus-CA, Mamma-CA) sowie steigendes Lebensalter und Lebensgewohnheiten wie Ernährung (u.a. bei Colon-CA) oder der Konsum von Rauschmitteln eine Rolle bei der Krebsentstehung. Angesichts weltweit steigender Inzidenzen und krebsbedingter Todesfälle steht außer Frage, dass die Entwicklung von effizienten Antitumormedikamenten unumgänglich ist. Bei bestehenden Therapien wurden zwar bereits große Fortschritte erzielt, jedoch sind die Erfolge immer noch unzureichend. Häufig finden aus Pflanzen und Pilzen gewonnene Substanzen oder deren Derivate, wie beispielsweise Acetylsalicylsäure aus *Salix sp* (Weide), Digitoxin aus *Digitalis*-Arten (Fingerhut) oder Penicillin aus *Penicillium chrysogenum*, therapeutische Verwendung bei unterschiedlichsten Erkrankungen. Auch in der Antitumorthherapie haben pflanzliche Chemotherapeutika einen großen Stellenwert. So werden hier beispielsweise in vielen Fällen Chemotherapeutika aus den Gruppen der Pflanzenalkaloide (z.B. Vincristin und Vinblastin aus *Catharanthus roseus*), Taxane (z.B. Paclitaxel aus *Taxus brevifolia*) oder Podophylotoxine (z.B. Etoposid aus *Podophyllum peltatum*) zur therapeutischen Verwendung herangezogen. Es besteht immer noch großer Bedarf an neuartigen, antiproliferativ wirksamen Substanzen und es gilt, dieses therapeutische Spektrum stetig zu erweitern, zu verbessern und potente pflanzliche Stoffe auch hinsichtlich ihrer Wirkung an Säugerzellen zu überprüfen. Auf diese Weise können neue Behandlungsmöglichkeiten ermöglicht, neue Reservemittel für resistente

Tumoren gefunden, oder die pharmakainduzierten Nebenwirkungen reduziert werden. In diesem Zusammenhang interessant, könnten beispielsweise einige *Phytophthora*-Arten sein, welche starke zyto-toxische Effekte an Tabakpflanzen hervorrufen.

1.2 ZYTOTOXISCHE EIGENSCHAFTEN VERSCHIEDENER PHYTOPHTHORA-PATHOGENE

Im Frühjahr 2008 wurden wir von Prof. Dr. W. Oßwald (Pathologie der Waldbäume, Technische Universität München) auf die Proteinfamilie der Elicitine aufmerksam gemacht, deren ausgeprägte zytotoxische Wirkungen auf Pflanzen der Familie der *Solanaceae* (Nachtschattengewächse) u.a. *Nicotiana tabacum* (Tabak) in vielen Experimenten gezeigt wurde [24; 25; 26]. Elicitine werden von allen bekannten *Phytophthora*-Arten in Kulturmedium abgegeben und sind auch in infiziertem Wirtsgewebe nachweisbar [27]. Das durch Elicitine verursachte lokale Absterben pflanzlicher Zellverbände wird dabei als hypersensitive Reaktion (HR= hypersensitive reaction) bezeichnet. Die Gattung *Phytophthora* wird in der neueren Systematik nicht mehr zu den „Echten Pilzen“, sondern zu den „Fungal-like Organisms“ gruppiert. Vertreter dieser Gattung sind den Algen (z.B. Kieselalgen) sehr viel ähnlicher als Vertretern der „Echten Pilze“. Die aktuelle taxonomische Einordnung nach Agrios GN (2005) lautet: II. Reich: Chromista (Stramenopiles), Stamm: Oomycota, Klasse: Oomycetes, Ordnung: Peronosporales, Familie: *Pythiaceae*, Gattung: *Phytophthora* [28]. *Phytophthora* (griechisch *phytón*, „Pflanze“ und *phthorá*, „Vernichtung, Zerstörung“; „die Pflanzenzerstörer“) stellen eine substantielle Ursache für Ernteaufschläge dar. Sie sind beispielsweise verantwortlich für die „Kartoffelfäule“ (*Phytophthora infestans*), für das Absterben von Sojabohnen (*Phytophthora sojae*) und Tabak (*Phytophthora parasitica*) [29] und vielen weiteren Pflanzen, sodass weltweit jährlich ca. 6 Milliarden Euro Schaden durch Ernteverluste entstehen [30]. Neben krautigen Pflanzen werden auch viele Holzpflanzen durch *Phytophthora* hauptsächlich über Wurzeln infiziert und durch sie abgetötet. So ist z.B. *Phytophthora cinnamomi* für das „Eukalyptussterben“ in Westaustralien (Großraum Perth) [31], *Phytophthora ramorum* für das „Sudden Oak Death“ (SOD) in Kalifornien [32], *Phytophthora quercina* für das „Eichensterben“ an einigen Standorten in Europa oder die kürzlich neu beschriebene *Phytophthora* taxon *Agathis* (PTA) für das Absterben der mehrere hundert Jahre alten Kauri-Bäume (*Agathis australis*) in Neuseeland primär verantwortlich [33]. In einigen Fällen, wie z.B. bei Tabakpflanzen, beruht diese zerstörerische Wirkung auf der Bildung von Elicitinen, einer Familie kleiner Holo-

proteine [26; 29], deren Aufbau und biologische Wirkung nun im Folgenden genauer erläutert wird.

1.3 ELICITINE, SPEZIFISCHE PEPTIDE DER PHYTOPHTHORA

Der Name Elicitin bedeutet ins Deutsche übersetzt soviel wie „auslösen“ (englisch „to elicit“ oder lateinisch „elicere“). Mittlerweile sind über 30 Phytophthora-Arten bekannt, die Elicitine produzieren [34]. In der Literatur gibt es viele Einzeldaten zu Elicitinen, jedoch sind diese nicht sehr systematisch und vollständig aufgearbeitet, weshalb es schwierig ist, Aussagen über die Wirkung der Elicitine im Allgemeinen zu treffen. Gemäß aktueller Literaturlage wurden anhand verschiedener Elicitine typische Merkmale herausgegriffen, auf deren Grundlage Hypothesen für diese Arbeit erstellt wurden. Die meisten Thesen beziehen sich hierbei auf Experimente mit den gut erforschten Elicitinen Cryptogein (*P. cryptogea*), Quercinin (*P. quercina*) und Citricolin (*P. citricola*).

Elicitine sind äußerst stabile Proteine. Für die Elicitine Quercinin, Citricolin und Gonapodyidin (aus *P. gonapodyides*) wurde beschrieben, dass sie selbst nach 15 minütigem Kochen ihre volle biologische Aktivität weiterhin entfalteten [25]. Molekular gesehen bestehen die meisten Elicitine aus 98 Aminosäuren. Essentiell für die Tertiärstruktur sind hierbei 6 konservierte Cysteinreste, die sich im Laufe der Evolution nur wenig verändert haben und maßgeblich zur Stabilisierung über 3 Disulfidbrücken beitragen. Elicitine verfügen über eine hydrophobe Domäne. Wenn diese an Sterol bindet, durchläuft das Molekül eine Konformationsänderung, welche wiederum für die Bindung an einem spezifischen Plasmalemma-Elicitinrezeptor von Bedeutung sein könnte [26]. Die Einteilung der Elicitine erfolgt durch Bestimmung des jeweiligen isoelektrischen Punktes in saure (alpha) ($pI < 7$) und basische (beta) ($pI > 7$) Isoformen, wobei die basischen Proteine dabei eine ungefähr 50- bis 100- mal stärkere nekrotische Wirkung entfalten können als die sauren Isoformen [29; 34]. Das in unseren Experimenten verwendete Elicitin Quercinin gehört zu diesen biologisch stärker aktiven, basischen (beta) Elicitinisoformen.

Während nur wenige *Phytophthora* Arten die biologisch aktiveren basischen Elicitine sezernieren, werden die sauren Isoformen von allen Arten gebildet [26]. Quercinin und das ebenfalls gut untersuchte Cryptogein sind dabei sehr homolog. So wird Quercinin in Western-Blotting-Versuchen auch vom Anti-Cryptogein-Antikörper gebunden [25; 27].

1.3.1 WIRKUNG VON ELICITINEN

Elicitine induzieren Abwehrmechanismen in Form einer hypersensitiven Reaktion (HR-Reaktion) mit lokal begrenztem Zelltod bei Pflanzen der Familien der *Solanaceae* (wie z.B. *Nicotiana tabacum* (Tabak) oder *Solanum tuberosum* (Kartoffel)) und der Kreuzblütengewächse *Brassicaceae* (wie *Brassica napus* (Raps) und *Raphanus sativus* (Rettich)) [26]. Neben der HR-Reaktion ist darüber hinaus auch noch eine induzierte Resistenz (induced resistance) gegenüber verschiedenen Pathogenen festzustellen, die durch Salicylsäureakkumulation vermittelt wird [35]. Die Nekrose um die vom Pilz befallene und mit Elicitin exponierte Stelle verhindert in diesem Falle eine weitere Ausbreitung der Phytophthora in der Pflanze. Plastisch formuliert besteht die Abwehrstrategie der Pflanze darin, einzelne Pflanzenteile zu opfern (partieller Selbstmord), um den Gesamtorganismus am Leben zu erhalten. Im Rahmen dieses Vorganges wurden sowohl apoptotische als auch nekrotische Prozesse registriert. Die Nekrosebildung bei mit isoliertem Cryptogein behandelten Tabakzellen wurde dabei durch mehrere Faktoren erklärt wie einer Plasmalemmerschädigung, einer Dekompartimentierung der Chloroplastenmembran sowie mit dem Rückgang des Zellurgors (entspricht dem Druck des Zellsaftes auf die Zellmembran). Ultrastrukturelle Analysen ergaben außerdem Veränderungen an den Plasmodesmata (Plasmastrang, der durch die Zellwand zwei Zellen miteinander verbindet und so einen Stoffaustausch ermöglicht) sowie Ablagerungen von filamentösem Material auf der inneren Zellwand des Xylems (Holzteil der höheren Pflanze; dient dem Transport von Wasser und anorganischen Salzen durch die Pflanze, hat aber auch Stützfunktion), was auf Veränderungen der Zellwand schließen lässt [26]. Außer der eben beschriebenen nekrotischen Wirkung des Elicitins Cryptogein ist auch eine apoptotische Wirkung beschrieben, welche sich in DNA-Fragmentierung und 3h nach Elicitinexposition auftretendem DNA-Laddering äußert [25; 36]. Welcher Zelltod jeweils über welche Signaltransduktion erfolgt, ist noch weitgehend unklar. Die Elicitinempfindlichkeit und die wirksamste Elicitin-Konzentration zur HR-Auslösung variiert dabei bei unterschiedlichen Kultivaren der gleichen Pflanzengattung. So induziert Quercinin zwar sowohl in den Tabakkultivaren BelW3 als auch in BelB Nekrosen, jedoch waren diese beim BelW3 schon früher und bei einer um Faktor 10 geringeren Konzentration sichtbar [24]. Als ursächlich für die durch Elicitine induzierten Wirkungen in der Pflanze werden unterschiedliche Mechanismen diskutiert, wie beispielsweise Rezeptor-vermittelte mitogen-activated protein Kinasen Signale (MAPK) [37], eine Zerstörung des zellulären Mikrotubuli Netzwerkes [38], Produktion von

radikalen Sauerstoffspezies (ROS) und eine damit verbundene Peroxidation der Lipidmembranen [39]. Diese Mechanismen werden nun im Folgenden im Detail erörtert.

1.3.2 SPEZIFISCHE REZEPTOREN UND MAP-KINASE-KASKADE

Wendehenne beschrieb bereits 1995 einen Rezeptor, an den Cryptogein bindet [40]. Die Bindung an den Rezeptor war dabei sättigbar, reversibel und spezifisch, was im Hinblick auf eine Verwertung als mögliches Antitumortherapeutikum essentielle Voraussetzungen sind. Die beste Bindung an den Rezeptor erfolgte dabei allerdings bei einem pH Wert von 7, während bei einem physiologischen pH-Wert des Menschen von 7,4 nur annähernd halb so viele Liganden an den Rezeptor gebunden waren [40]. Die halbmaximale Sättigung des Rezeptors war schon bei einer Cryptogeinkonzentration von 2nM erreicht, während die volle Rezeptorsättigung bei einer Konzentration von 5-10nM erreicht wurde. Eine weitere Konzentrationserhöhung auf bis zu 1000nM zeigte keine Hinweise auf erhöhte Ligandenbindung. Nach dieser Interaktion von Elicitin (in diesem Falle Cryptogein) mit dem Elicitin-Rezeptor sind sehr wahrscheinlich dessen Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung die ersten Reaktionen der Signalkaskade [40].

Wie Kanzaki 2008 [41] beschrieb, bindet z.B. das von *Phytophthora infestans* synthetisierte Elicitin INF-1 den in Tabakzellen befindlichen NbLRK1-Rezeptor sowohl *in vivo* als auch *in vitro*. Die folgende Rezeptorphosphorylierung gilt sehr wahrscheinlich als ursächlich für die Induktion des darauffolgenden hypersensitiven Zelltodes. Diese These wird dadurch erhärtet, dass die hypersensitive Antwort zeitlich verspätet ausfällt, wenn der NbLRK1-Rezeptor in der Plasmamembran durch silencing ausgeschaltet wurde. Yang et al. [42] beschrieb, dass der hypersensitive Zelltod in Tabak ebenfalls durch mitogen aktivierte Protein-Kinase-Kaskaden (MAPK) vermittelt wird.

In Tabak wird die MAPK-Kinase NtMEK2 aktiviert, die ihrerseits durch Aktivierung der weiter downstream in der Kaskade liegenden Proteinkinasen, wie die Salicylic-acid-induced-protein kinase (=SIPK) und die wounding-induced protein kinase (WIPK) Zelltod vermittelt. In gleicher Weise spielen MAPK-Signalwege in Säugerzellen eine wichtige Rolle in der Regulation des Zellzyklus, sodass hier eventuelle Gemeinsamkeiten der Elicitinwirkungen zwischen Pflanzen- und Säugerzellen zu erwarten sein könnten.

1.3.3 ELICITIN INDUZIERTE SIGNALTRANSDUKTION

1.3.3.1 Ionenfluss über Membranen

Ungefähr 30 Minuten nach der Rezeptorbindung ist ein starker Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle festzustellen, der zeitgleich mit einer extrazellulären Alkalisierung sowie einem K^+ -Ausstrom einhergeht [43]. Gerade der Ca^{2+} -Einstrom scheint hierbei eine wichtige Rolle für die Signaltransduktionskaskade zu spielen, da die typischen Elicitin-Effekte wie Zelltod oder Mikrotubulidepolymerisation verringert oder ganz unterbunden wurden, wenn dieses Ca^{2+} durch Applikation von Ca^{2+} -Chelatoren wie EGTA oder La^{3+} künstlich als Komplex gebunden wurde [44; 45]. Wenige Minuten nach diesen Ionenflüssen kann ebenfalls eine transiente Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in der Tabakzellkultur gemessen werden, was auch als „Oxidative Burst“ bezeichnet wird [24; 43; 46].

1.3.3.2 Oxidative burst (O_2^- , H_2O_2) und Zelltod

Bezüglich der pflanzlichen ROS-Synthese gibt es unterschiedliche Daten. Während einige Autoren [47] die auch bei Neutrophilen Granulozyten in Säugern vorkommende NADPH-Oxidase der Plasmamembran als Ort der ROS Synthese angeben, zeigten andere Autoren auch zellwandgebundene Peroxidasen als ROS-Quelle. Letztere sollten jedoch beim Menschen nicht vorkommen, da Säugerzellen keine Zellwand besitzen [24; 48]. Durch diese Oxidasen entstehen, durch mitochondriales Ca^{2+} getriggert [49], intrazelluläre ROS in den Mitochondrien, sowie bei der Glykolyse [50; 51]. Die Ca^{2+} getriggerte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies dauert in der Pflanze 5 bis 7 Stunden an [39; 52], wobei die H_2O_2 -Produktion bereits 50 Minuten nach Applikation von Cryptogein signifikant erhöhte Werte erreicht [24]. Wie Koehl et al. [24] und Pascholati et al. [26] demonstrierten, erfolgt die Produktion von ROS nach der Quercininapplikation in der Tabakzellkultur dabei dosisabhängig. Diese ROS können mit Lipiden der Zellmembranen unter Bildung von Fettsäurehydroperoxiden reagieren, wodurch die Zellmembran ihre Integrität lokal verliert [44]. Es wurde allerdings auch gezeigt, dass weder H_2O_2 noch O_2^- (Superoxidanion) für den Zelltod per se verantwortlich sind, weil weder eine Zugabe des NADPH-Oxidase-Inhibitors Diphenyleniodonium, noch die Zugabe der Enzyme Katalase (baut H_2O_2 zu Wasser und Sauerstoff ab) und Superoxiddismutase (bildet aus Superoxidanionen H_2O_2) einen Einfluss auf den Untergang der Zellen zeigten [24].

1.3.4 WEITERE ELICITINWIRKUNGEN

Andere in elicitinexponierten Pflanzen auftretende Effekte, welche bei Säugerzellen jedoch aufgrund der von der Pflanze abweichenden Zellanatomie und -physiologie nicht relevant erscheinen, sind z.B. die Akkumulation von antimikrobiell wirksamen Phytoalexinen [53], die Verdickung der Zellwand [40] sowie die Produktion von Ethylen [43].

Elicitineffekte, die wiederum möglicherweise bei Säugerzellen relevant sein könnten, sind die Aktivierung von Abwehrgenen [54], eine ROS-abhängige Endocytosestimulation [55], eine Zerstörung des Mikrotubuliapparates und der Transport von Sterolen.

1.3.4.1 Steroltransport

Wie unter Punkt 1.2 dargelegt, ist die zelltodinduzierende Elicitinwirkung spezifisch für lediglich einige wenige Pflanzenspecies. Diese Beobachtung führt nun zu der Frage, welche physiologischen Funktionen Elicitine normalerweise haben. Es gilt als gesichert, dass Elicitine wie z.B. Cryptogein die Fähigkeit besitzen, Sterolmoleküle zwischen verschiedenen Membranen zu befördern [26]. Dieser Transport wurde experimentell sowohl zwischen fluoreszierenden Dihydroergosterol-Donor-Micellen und Cholesterol-Akzeptor-Micellen einerseits, als auch zwischen Micellen und aufgereinigten biologischen Plasmamembranen der Pflanze andererseits, nachgewiesen [56]. Interessanterweise scheint dieser Steroltransport-Mechanismus essentiell für das Überleben von *Phytophthora*-Arten zu sein, da diese selbst keine Sterole produzieren. Ferner müssen *Phytophthora* die Sterole von Plasmamembranen befallener Pflanzen aufnehmen, weil diese Moleküle essentiell für die *Phytophthora*-Fortpflanzung und deren vegetatives Wachstum ist [26; 34]. Die biologische Aktivität unterschiedlicher Elicitine hängt dabei von deren Sterolbindungs-Effizienz ab. Sterolaffine Elicitine mit effizienterer Sterolbindung, wie Cryptogein, haben dabei eine stärkere zelltötende Wirkung in der Pflanze als Elicitine mit schwächerer Sterolbindung [57]. Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass mutierte Elicitine mit schlechteren Sterolbindeeigenschaften eine geringere biologische Aktivität aufwiesen als die Wildtypvariante [57; 58; 59]. Falls Elicitine auch bei Tumorzellen die steroltransportierenden Eigenschaften entfalten, wären zelltötende Effekte auch ohne spezifischen Elicitinrezeptor, beispielsweise lediglich durch Beeinflussung der Plasmamembranintegrität, denkbar.

1.3.4.2 Mikrotubulizerstörung

Neben der Fähigkeit zum Steroltransport, besitzt Elicitin als weitere interessante Eigenschaft das Potential, Mikrotubuli zu zerstören. Bereits nach einstündiger Exposition mit 25nM Cryptogein können bei pflanzlichen Zellen starke Depolimerisationseffekte des Mikrotubuliapparates sichtbar gemacht werden [38]. Diese ROS-unabhängige Zerstörung der Mikrotubuli war sogar dann feststellbar, wenn die pflanzlichen Mikrotubuli mittels Taxol, einem gängigen Inhibitor der Mikrotubulidepolimerisation, hyperstabilisiert wurden [38].

1.4 ELICITINE ALS MÖGLICHE ANTITUMORPEPTIDE

1.4.1 ALLGEMEINES

In etwa 60 % der beim Menschen vorhandenen Gene entsprechen den Genen von Pflanzen und Hefen. Gemeinsame Gene kodieren dabei unter anderem auch für hochkonservierte Signalkaskadenwege wie z.B. die MAPK-Kaskaden [60; 61]. Es ist also demnach durchaus denkbar, dass die für Elicitine bei Pflanzen beschriebenen Möglichkeiten in die Zellregulation einzugreifen auch bei Säugerzellen zu erwarten sind. So sind wichtige Elicitin-Wirkmechanismen wie MAPK-Kaskaden [57], H₂O₂-Produktion [24; 39; 43; 46; 52] Mikrotubulizerstörung [38; 44; 45] auch als Therapiekonzept bei humanen Tumorzellen beschrieben, weshalb es ein interessanter Ansatz ist, verschiedene Elicitine auch an Säugerzellen zu testen.

1.4.2 ROS

Es ist bekannt, dass die ROS-Produktion in Tumorzellen, durch erhöhten metabolischen Stress und gesteigertes Proliferationsverhalten gegenüber normalen Zellen, erhöht ist [62; 63; 64; 65]. Um die ROS-Konzentrationen in tolerierbaren Bereichen zu halten, verfügen Tumorzellen über antioxidative Systeme wie die Mangan-Superoxid-Dismutase (SOD), Katalase und Glutathion Peroxidase [62]. Es ist denkbar, dass Tumorzellen deshalb sensitiver auf oxidativen Stress reagieren als normale Zellen, weil die ROS-Konzentrationen dort bereits erhöht sind und die Schwelle zur ROS-Toxizität somit schneller überschritten werden kann [66]. So zeigte Chen et al. (2008) [63] dass H₂O₂ an der Zersetzung und Wiederaufbereitung cytoplasmatischen Materials beteiligte, autophagische Prozesse in den Tumorzelllinien HEK293, HeLa und U87 auszulösen vermag, jedoch nicht in benignen murinen Astrozyten [67; 68; 69;

70; 71]. Neben autophagischen Prozessen können durch erhöhte toxin- oder strahlungsinduzierte H_2O_2 -Konzentrationen auch Säuger-MAP-Kaskaden aktiviert werden oder einen hohen Level an oxidativem Stress auf die Zellen ausüben [72]. Wenn die zelleigenen, antioxidativen Mechanismen die anfallenden ROS nicht mehr ausreichend abbauen können, kommt es in der Folge zu einer verstärkten Schädigung von Zellbestandteilen wie Proteinen, Lipiden, Kohlenhydraten und DNA. Über eine oxidative, irreversible DNA-Schädigung kann sich die Transkription darüber hinaus nun dahingehend qualitativ verändern, dass die Zellzyklusregulation beeinflusst wird und Gene wie GADD45, GADD153 oder WAF-1 (WAF-1 kodiert für p21) verstärkt transkribiert werden [72] (Abbildung 3).

Welche MAPK dabei von H_2O_2 aktiviert werden, hängt unter anderem auch von der H_2O_2 Konzentration ab. Bei humanen Leukämiezellen (U937) führte deren Exposition mit geringer H_2O_2 Konzentration ($20\mu\text{M}$) zuerst zu einer gesteigerten p38 MAPK Phosphorylierung mit anschließendem Zellzyklusarrest [47]. Wenn die H_2O_2 Konzentration gesteigert wurde (1mM), wurden zusätzlich auch JNK und die upstream liegende MAPKK aktiviert und die Zellen wurden *apoptotisch* [48]. Wenn Elicitine nun also die Produktion größerer Mengen H_2O_2 induzieren könnten, wäre dies unter Umständen ebenfalls ein Krebstherapieansatz.

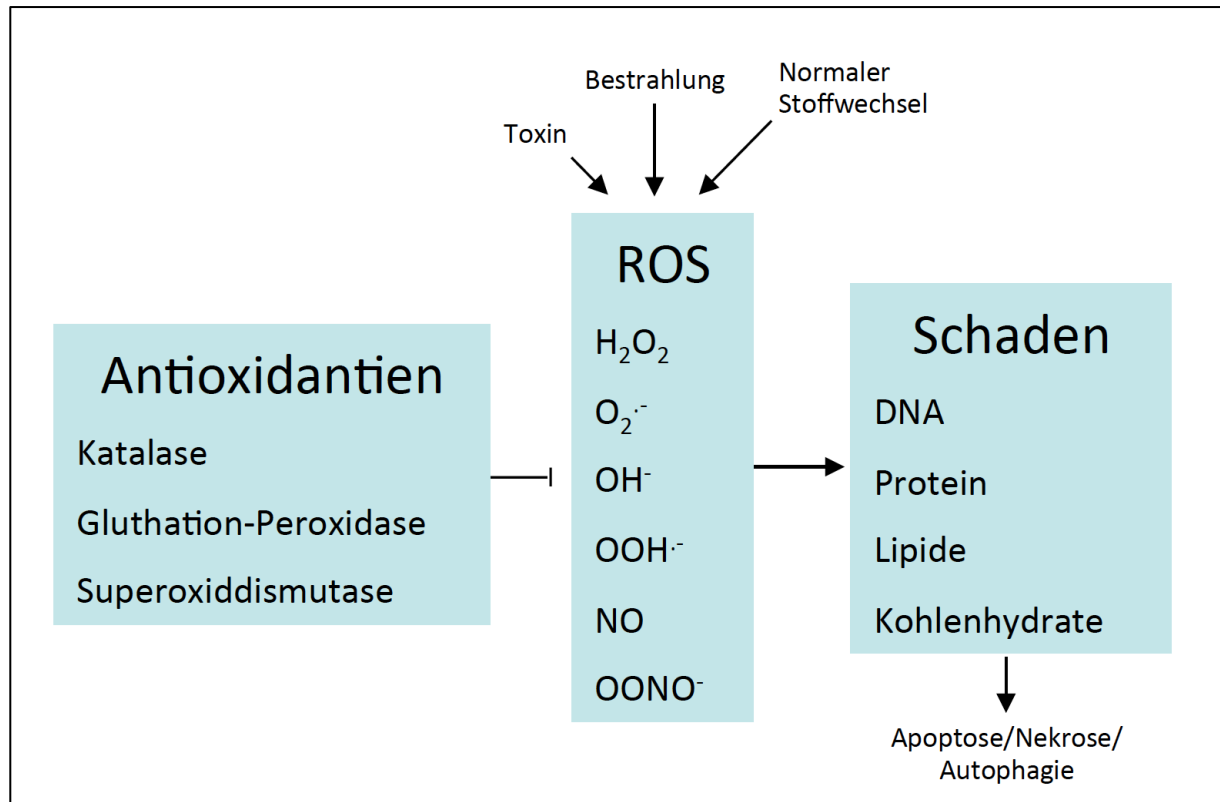


Abbildung 3 Wirkungsweise von ROS auf Zellen. Durch Schädigung von Zellstrukturen kann über ROS Zelltod vermittelt werden. Verändert nach Fulda, 2010 [73] “Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death”

1.4.3 MIKROTUBULIDESTRUKTION

Ebenfalls relevant für die Antitumorthherapie könnten die depolymerisierenden Effekte der Elicitine am Mikrotubulisystem sein, weil humane Spindelapparate ebenfalls aus Mikrotubuli aufgebaut sind. Während einer eukaryotischen Zellteilung muss die Mutterzelle ihren Chromosomensatz einmal replizieren und im Anschluss daran die kopierten Chromosomensätze auf die Tochterzellen verteilen. Fehler bei der Koordination der Replikation oder der anschließenden Verteilung auf die Tochterzellen kann nun schwerwiegende Folgen wie Aneuploidie oder genetische Instabilität der Zellen haben, die die mitotische Tumorzellproliferation stoppen könnte [74; 75; 76; 77]. Dieses Prinzip machen sich bereits einige auf dem Markt befindliche Chemotherapeutika wie die Alkaloide Vinblastin, Colchicin und Taxane zu Nutze [78; 79].

Auf welche Weise die Mikrotubulifunktion pharmakologisch gestört wird, erscheint dabei irrelevant: Substanzen, die den Abbau von Mikrotubuli hemmen (z.B. Paclitaxel), wirken ebenso antiproliferativ wie Substanzen, welche die Synthese der Mikrotubuli hemmen (z.B. Colchicin oder Vinblastin). Neben der Mitoseinhibition kann die Mikrotubulidepolimerisation in Säugerzellen auch eine veränderte Transkription bewirken [80]. So wurde bei humanen Brustkrebszellen beispielsweise eine durch Mikrotubulizerstörung induzierte Hyperphosphorylierung des Proteines BCL2 festgestellt, welche im Anschluss Apoptose induziert [81].

1.4.4 VERGLEICHBARE SIGNALKASKADEN (MAP-KINASEN; BILDUNG VON ROS)

Neben den Wirkungen auf mikrotubuläre und oxidative Zellsysteme kann Elicitin auch über MAPK-Kaskaden wirken, die ebenfalls bei humanen Zellen vorkommen. Die mehrstufigen MAPK-Signaltransduktionswege spielen in der Pflanze hauptsächlich bei Funktionen wie Stresstoleranz und Hypersensitiver Reaktion eine Rolle [30] und sind beim Menschen an essentiellen Prozessen wie Zellwachstum, Proliferation, Apoptose, Entzündung und Differenzierung und Stressreaktionen (u.a. induziert durch UV-Licht, osmotischer Schock und Mitogene) beteiligt [82]. Die MAPK-Kaskade besteht dabei aus drei hintereinandergeschalteten Kinasen: Die upstream befindliche MAP-Kinase-Kinase-Kinase (=MAPKKK) phosphoryliert die

downstream befindliche MAP-Kinase-Kinase (=MAPKK), welche wiederum eine MAP-Kinase phosphoryliert. Ab hier können nun, über diverse Transkriptionsfaktoren vermittelt, eine Vielzahl weiterer Signalwege folgen [83].

MAPK-Kinasen spielen insbesondere bei Tumorzellen eine wichtige Rolle [84]. So werden bei 30% aller humanen Tumorzellen und bei 60% aller malignen Melanome aufgrund einer Mutation der upstream gelegenen Proto-Onkogene Ras und Raf (MAPKKK) die Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase (MAPKK) MEKK 1 und 2 aktiviert. Diese aktivieren anschließend die MAPK ERK1 und ERK2, welche dann im Zellkern eine Reihe von Transkriptionsfaktoren phosphorylieren, wodurch schlussendlich eine gesteigerte Zellproliferation induziert wird [82]. Ein anderer bei humanen Tumorzellen wichtiger MAPK-Signaltransduktionsweg läuft über die MAPKK MKK4, welche sowohl die weiter abwärts gelegene MAPK p38 als auch JNK spezifisch aktiviert. Über eine anschließende Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie c-jun, elk-1 und ATF-2 [85] sind diese unter anderem an Zelldifferenzierung, Zellwachstum und Apoptose beteiligt. Neben den MAPK-Kinasen p38 und JNK 1-3 sind noch ERK1+2 (entspricht p44/42) als wichtige Familien beschrieben [86], welche allesamt in Westerblots auf ihre Induzierbarkeit durch Elicitin überprüft wurden.

In der Pflanze läuft die MAPK vermittelte HR wie folgt ab: Zuerst binden und aktivieren sogenannte „PAMPs“ (englisch „Pathogen-associated molecular patterns“) wie z.B. bakterielles Flagellin, Zellwandpolysachharide, Peptidoglykane oder Chitin membranständige LLR-Rezeptorkinasen („Leucin-rich-repeat-rezeptorkinase“). Im Anschluss kommt es daraufhin zu einer Aktivierung von MAPKK wie beispielsweise NtMEK2, die die downstream liegenden MAPK SIPK („salicylic-acid induced protein kinase“) und WIPK („wounding-induced protein kinase“) [57] aktiviert und neben einer für die systemische Resistenz wichtige Salizylsäuresynthese auch die HR vermittelt, indem pflanzliche Abwehrgene wie PAL („Phenylalanin ammonium lyase“) oder HMGR („3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase) verstärkt abgelesen werden [42]. Neben dem Ablauf der MAPK-Kaskade kommt es ebenfalls zu einem Ca^{2+} Einstrom, der zu einer ROS-Bildung durch membranständige NADPH-Oxidasen führt, welche wiederum direkt oder indirekt (durch Mitochondrienzerfall bedingten Austritt von Cytochrom c) zu Zelltod führt. Ein schematischer Vergleich von humanen und pflanzlichen MAPK-Kaskaden ist in Abbildung 4 exemplarisch dargestellt.

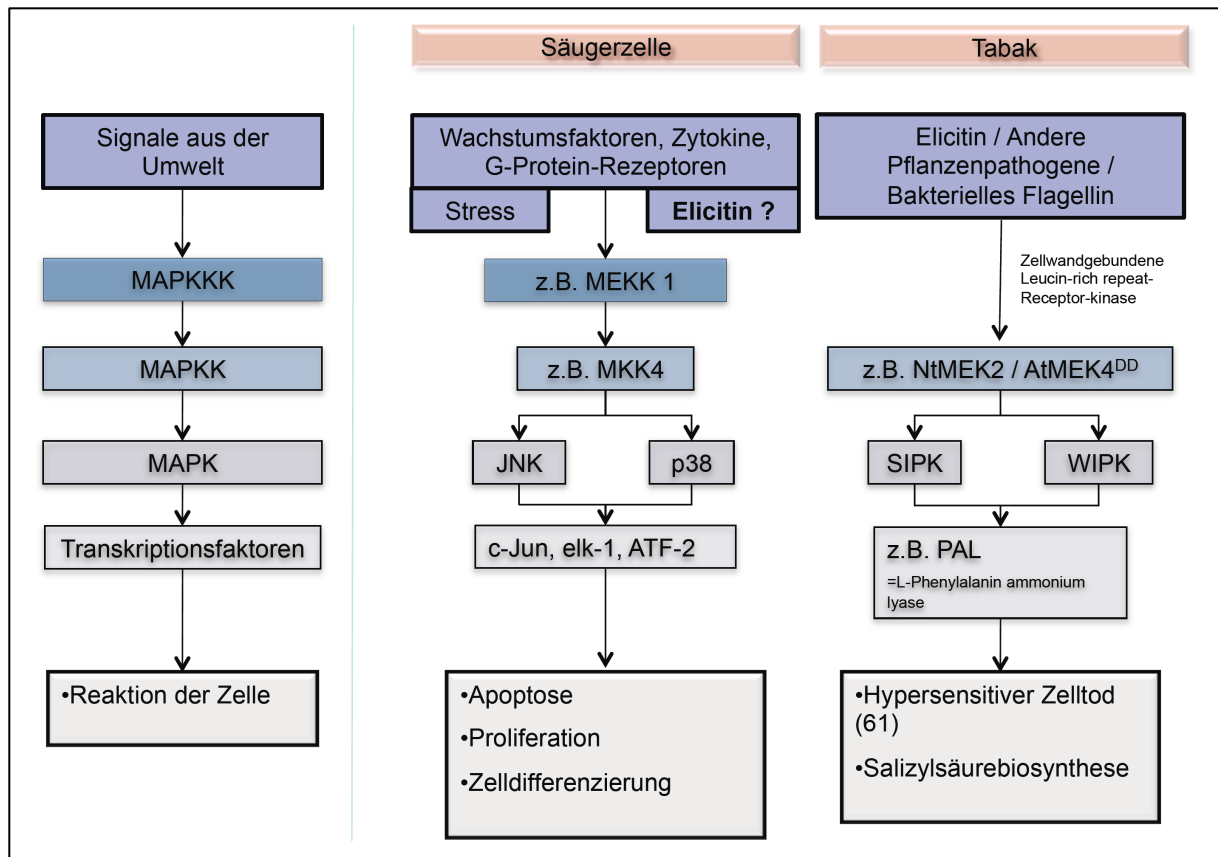


Abbildung 4 Schematische Darstellung des MAPK-Kaskadenmechanismus in Säugerzellen und Tabak. Es ist denkbar, dass zelltodinduzierende MAPK-Kaskaden auch bei Säugerzellen durch Elicitin getriggert werden können. Verändert nach [42; 57].

Ein weiterer wichtiger, bei Tumorzellen vorkommender, Signalweg ist PI3K-Pathway, welcher seine Wirkung über die weiter Downstream liegenden Proteine mTOR und AKT vermittelt. Das Immunsuppressivum Rapamycin, welches in allen Versuchen als Kontrollsubstanz verwendet wurde, greift in diesen AKT/mTOR-Signaltransduktionsweg ein und bildet einen Komplex mit FKBP-12 (FK-bindendes Protein), welcher wiederum an mTOR bindet (mammalian target of rapamycin) und so den AKT/mTOR Signaltransduktionsweg hemmt. Dadurch kommt es zu einer Aktivitätsminderung der p70S6-Kinase und damit zu einer Unterbrechung des IL-2- und VEGF-Signaltransduktionsweges (**Abbildung 5**).

Die durch die Hemmung der p70S6 Kinase vermittelte antiproliferative Wirkung äußert sich sowohl in Form von Immunsuppression (verminderte Lymphozytenproliferation), als auch durch ein verringertes Tumorstadium (verminderte Tumorstadium) und einer verringerten Neoangiogenese (verringerte Endothelproliferation).

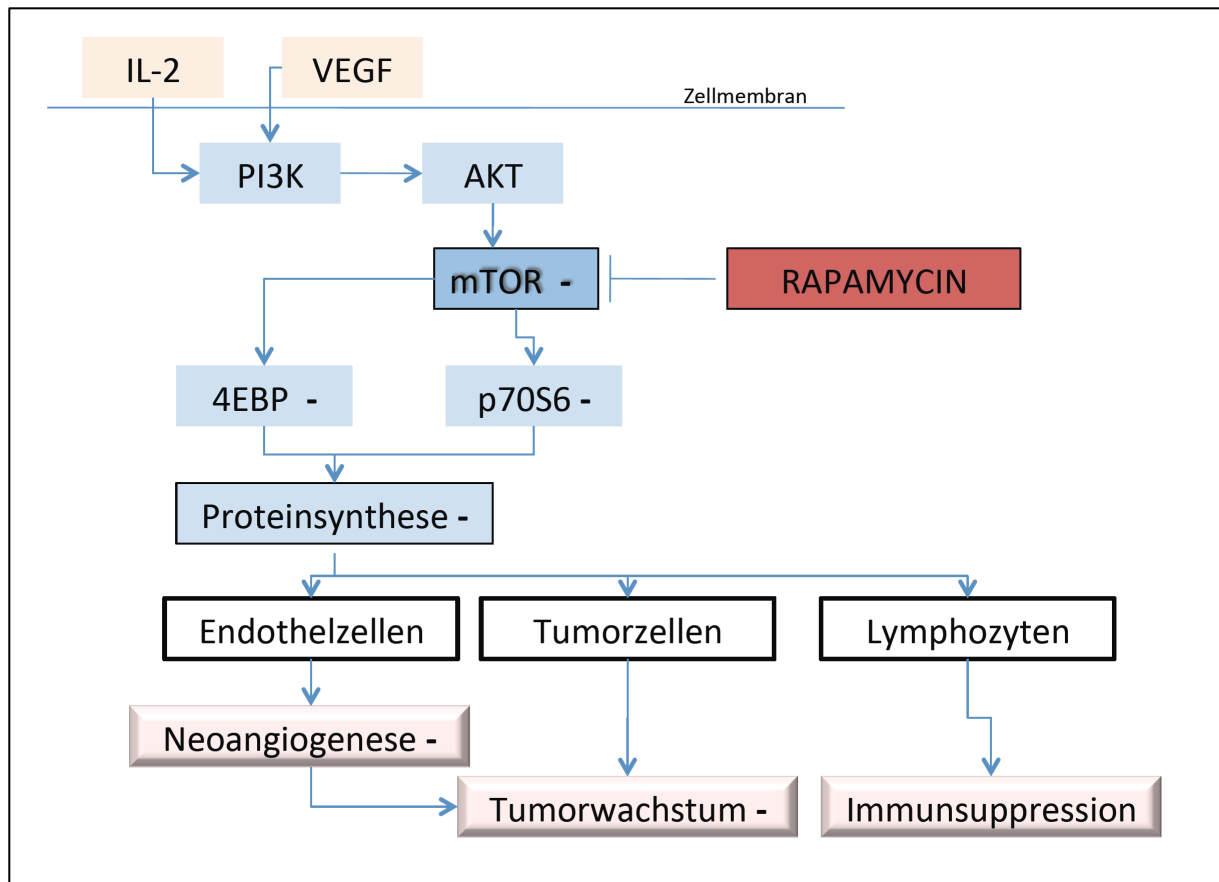


Abbildung 5 Schematische Darstellung der Wirkungsweise von Rapamycin über eine Aktivierung der p70S6-Kinase. Rapamycin bewirkt über eine Inhibition von mTOR in unterschiedlichen Zellen eine Hemmung von Neoangiogenese und Tumorstadium, sowie Immunsuppression. Angelehnt an [87].

1.4.4 SPEZIFISCHE FRAGESTELLUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wird folgende These untersucht:

Welchen Einfluss haben die Elicitor Quercetin und Citricolin auf Wachstum, Proliferation, Signaltransduktion und Zelltod unterschiedlicher Tumorzellen und nicht entarteter Zellen in vitro?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 GEWINNUNG UND ISOLATION DER ELICITINE

*2.1.1 ELICITINE AUS EINEM AKTIVEN *P. QUERCINA* UND *P. CITRICOLA* ISOLAT*

Die Gewinnung und Aufreinigung aller Elicitine erfolgte in den Laboratorien von Prof. Dr. Oßwald, TU-München. Beide Phytophthora-Pathogene wurden, wie von Koehl et al. (2003) [24] beschrieben in Flüssigkultur für 8 Tage angezogen. Das lyophilisierte Kulturfiltrat wurde in 100ml Natrium-Phosphat-Puffer (100mM, pH 6.8) gelöst und gegen ein Volumen von 8L des gleichen Puffers dialysiert. Anschließend wurde das Dialysat auf einen Anionentauscher (Streamline QXL, GE Healthcare; äquilibriert mit dem obigen Puffer) gepumpt (Fluss 1ml/min). Der Durchfluss wurde aufgefangen, lyophilisiert, in 5ml Natrium-Phosphat-Puffer (100mM, pH 7,1) aufgenommen und gegen 1L des gleichen Puffers dialysiert. Diese Proteinlösung wurde anschließend an einer Gelfiltrationsäule (Hi-Prep S-100; Laufpuffer: Natrium-Phosphat-Puffer 100mM, pH 7,1; Fluss 1ml/min; Messung der Absorption bei Wellenlänge 220nm) weiter aufgetrennt und der Durchfluss in 6ml Fraktionen aufgefangen. Die Fraktionen 24-27 enthielten die basischen Elicitine. Diese Fraktionen wurden vereinigt, lyophilisiert, in 5ml Natrium-Phosphat-Puffer (100mM, pH 7,1) aufgenommen und gegen 1L des gleichen Puffers dialysiert. Die so erhaltenen Elicitine wurden als Quercinin I von *P. quercina* und Citricolin I von *P. citricola* bezeichnet. *Mit diesen Elicitinfraktionen wurden die Experimente 1 bis 3 durchgeführt.*

*2.1.2 ELICITINE AUS EINEM FÜR ZWEI JAHRE IN DER MYKOTHEK GELAGERTEN *P. QUERCINA* ISOLAT*

*2.1.2.1 Gemeinsame Aufreinigung der sauren und basischen Elicitine aus dem Kulturfiltrat von *Phytophthora quercina**

Das lyophilisierte Kulturfiltrat wurde in 100ml Natrium-Phosphat-Puffer (100mM, pH 5) gelöst und in einem Volumen von 8L des gleichen Puffers dialysiert. Anschließend wurde das Dialysat auf einen Anionentauscher (Streamline QXL, GE Healthcare; äquilibriert mit dem

obigen Puffer) gepumpt (Fluss 1ml/min). Der Durchfluss wurde aufgefangen und mit Phosphorsäure auf einen pH-Wert von 3,5 eingestellt. Danach wurde die Lösung auf einen Kationentauscher (Fraktogel EMD SO_3^- , Merck, Deutschland, äquilibriert mit Natrium-Phosphat-Puffer 100mM, pH 3.5) gepumpt. Der Fluss betrug wiederum 1ml/min. Die unter diesen Bedingungen ionisch gebundenen Elicitine wurden mit 20ml Na-Phosphatpuffer (100mM, pH 3,5 versetzt mit 400mM NaCl) von der Säule gelöst. Das Eluat wurde anschließend gegen 20mM Na-Phosphatpuffer, pH 3,5 dialysiert. Die Lösung wurde danach auf den Anionentauscher (siehe oben) gepumpt, welcher zuvor mit $\text{Na H}_2\text{PO}_4$ (100mM; pH 3,5) äquilibriert wurde. Die im Durchlauf aufgefangenen Elicitine wurden lyophilisiert, in 5ml Natrium-Phosphat-Puffer (100mM, pH 7,1) aufgenommen und gegen 1L des gleichen Puffers dialysiert. Diese Proteinlösung wurde anschließend an einer Gelfiltrationsäule (Hi-Prep S-100; Laufpuffer: Natrium-Phosphat-Puffer 100mM, pH 7,1; Fluss 1ml/min; Detektion bei Wellenlänge 220nm) weiter aufgetrennt. Die weitere Reinigung entsprach der unter 2.1.1 beschriebenen Vorgehensweise.

Diese aufwändige Aufreinigung wurde drei Mal wiederholt; die entsprechenden Elicitinfraktionen wurden bezeichnet als **AF3 1.1**; **AF3 1.2** und **AF32**. *Mit diesen Elicitinfraktionen wurden die Experimente 4 bis 14 durchgeführt.*

2.1.2.2 Aufreinigung von *P. quercina* Elicitinen bei verschiedenen pH-Werten

In drei Aufreinigungsverfahren wurden die *P. quercina* Elicitine bei den pH-Werten 3, 6 und 8 getrennt angereichert. Dazu wurde das lyophilisierte Kulturfiltrat in 100ml Natrium-Phosphat-Puffer (100mM, pH 3, 6 oder 8) gelöst und in einem Volumen von 8 L des entsprechenden Puffers dialysiert. Anschließend wurde das Dialysat auf einen Anionentauscher (Streamline QXL, GE Healthcare), der mit Puffern der pH-Werte 3, 6 oder 8 äquilibriert war, gepumpt (Fluss 1ml/min). Die weiteren Reinigungsschritte entsprechen denen unter Punkt 2.1.1. Diese Aufreinigung lieferte uns die Elicitine Q3, Q6 und Q8. *Mit diesen Elicitinfraktionen wurden die Experimente 15 bis 18 durchgeführt.*

2.1.2.3 Aufreinigung der basischen Elicitine aus dem Kulturfiltrat von *P. quercina*

Das lyophilisierte Kulturfiltrat wurde in 100ml Natrium-Phosphat-Puffer (100mM, pH 7,2) gelöst und in einem Volumen von 8L des gleichen Puffers dialysiert. Diese Lösung wurde auf einen Anionentauscher (Streamline QXL, GE Healthcare) gepumpt (Fluss 1ml/min), der mit dem obigen Puffer äquilibriert war. Der Durchfluss enthält das basische Elicitin Quercinin. Die weitere Aufreinigung an der Gelfiltrationssäule entspricht der in Punkt 2.1.1 beschriebenen Vorgehensweise. *Mit dieser Elicitinfraktion wurden die Experimente 19 bis 24 durchgeführt.*

2.1.3 AKTIVITÄTSTEST DER GEREINIGTEN ELICITINFRAKTIONEN

Die Aktivität der Elicitine wurde im „Tabak-Test“ überprüft [88]. Dazu wurde Protein in der Konzentration 1µg/ml nach Standardmethode in das Tabakblatt (*Nicotiana tabacum*) infiltriert. Nach drei Tagen zeigten die Stellen, die mit den Elicitinen behandelt wurden die typischen, auf der HR-Reaktion beruhenden, Blattnekrosen. Als Kontrolle wurde Wasser (dest) infiltriert, wobei es hier zu keinen Absterbeerscheinungen kam.

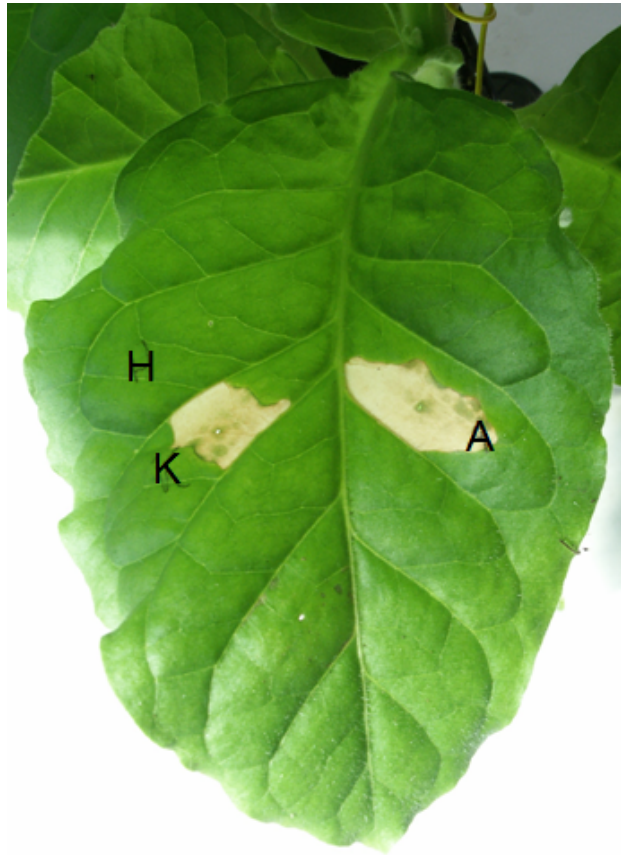


Abbildung 6 Beispielhafte Darstellung der Aktivität der *P. quercina* Elicidine, die hypersensitive Reaktion in Tabakblättern auszulösen. H = Wasserkontrolle; K entspricht Elicitin Q3 A: entspricht Elicitin Q8 (siehe 2.1.2.2)

2.2 PROTEINQUANTIFIZIERUNG MIT BCA

Prinzip

Laut persönlicher Kommunikation mit Prof. Dr. Oßwald ist die quantitative Proteinbestimmung von Elicitinen ausschließlich mit dem BC-Assay (=bicinchoninic acid) realisierbar. Diese, nach der Biuretreaktion entwickelte, kolorimetrische Proteinquantifizierungsmethode basiert darauf, dass Peptidbindungen der Proteine Cu^{2+} Ionen in alkalischem Medium zu Cu^{+} Ionen reduzieren. Diese Cu^{+} Ionen werden vom BC-Assay nun als Chelatkomplex gebunden und als Ergebnis bildet sich ein purpur gefärbter, wasserlöslicher, photometrisch messbarer Komplex (Abbildung 7). Durch die mit definierten Albuminmengen von 400, 320, 240, 160, 100, 80, 60, 20, 0 $\mu\text{g/ml}$ ermittelte Standardkurve lässt sich im Anschluss an die fotometrische Messung die Konzentration des gesuchten Proteins errechnen.

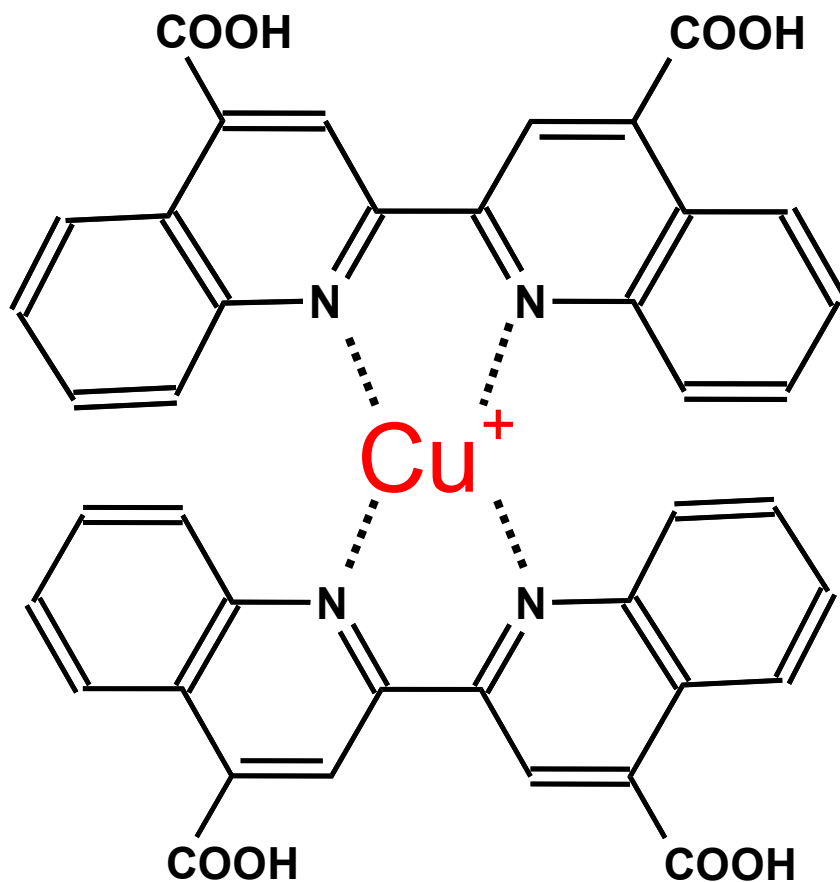


Abbildung 7 Purpur gefärbter, wasserlöslicher, photometrisch messbarer Chelatkomplex des BC-Assays nach Cu^+ Bindung. Anschließend erfolgt die rechnerische Bestimmung der Konzentration.

Verwendet wurde der BC-Assay von Interchim [M33] (Siehe Geräteliste im Anhang).

Zuerst wurden jeweils 20 μl der Standards, sowie 20 μl der Proben in zweifacher Ausführung in 96-Well Platten pipettiert. Die Proben wurden dabei so verdünnt, dass sich die gemessene Proteinkonzentration im Bereich der Standardkurve befindet. Dieser Verdünnungsfaktor wurde nachher wieder mit eingerechnet. Im nächsten Schritt wurden in die Wells jeweils 200 μl des BCA-Reagens hinzugefügt, welches aus der Mischung von 400 μl des mitgelieferten „Reagens B“ mit 20 ml des „Reagens A“ besteht.

Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37°C auf dem Schüttler erfolgte die spektrometrische Messung im Photometer bei 540nm.

2.3 ZELLKULTUR

Die in-vitro-Zellproliferationsversuche wurden mit 6 unterschiedlichen Zelllinien durchgeführt, wobei 4 Tumorzelllinien und 2 Primärzellkulturen untersucht wurden (siehe Tabelle 1).

Zelllinie	Abkürzung im Text	Dignität	Ursprung
B16-F10-Melanom	B-16	Maligne	<u>Murin</u> , Melanom
CT26-Colon-Adenokarzinom	CT-26	Maligne	<u>Murin</u> , Colon-CA
LLC-1-Lewis Lung Karzinom	LLC-1	Maligne	<u>Murin</u> , Lungen-CA
TMK-1-Magenkarzinom	TMK-1	Maligne	<u>Human</u> , Magen-CA
Human umbilical vein endothelial cells	HUVEC	Benigne	<u>Human</u> , Gefäßendothel aus Nabelschnurvene
Keratinocyten	HEK	Benigne	<u>Human</u> , neonatal

Tabelle 1 Übersicht über Zelllinie, Abkürzung, Dignität und Ursprung der in den Experimenten verwendeten Zellen.

Verwendet wurden B-16-F10-Melanomzellen [M1] aus der C57BL/6J-Maus, CT-26 Colon-Adenocarcinomzellen [M2] aus der BALB/c-Maus [89] und murine Lungenkarzinomzellen (=LLC-1, Lewis Lung Carcinoma cells, [M6]). Als humane Zellen wurden die wenig differenzierten humanen Magenkarzinomzellen TMK-1 [90] [M3], humane Gefäßendothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC, human umbilical vein endothelial cells, [M4]) und humane nicht entartete Keratinocyten (=HEK, Human epidermal Keratinocytes, [M5]) verwendet. Genauere Erläuterungen im Detail sind in der Geräte- bzw. Materialliste beschrieben (siehe 8.1 und 8.2). HUVECs wurden, entsprechend den Herstellerangaben, mit Endothelzellmedium [M7] und Supplement Pack [M8] kultiviert. TMK-1 wurden unter Zusatz von 1% L-Glutamin [M9], 10% fetalem Kälberserum (FCS, fetal calf serum, [M10]), 1% Penicillin-Streptomycin [M11] und 1% Vitaminen [M12] in Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM, [M13]) kultiviert. B-16-F10 und CT-26-Tumorzellen wurden in RPMI 1640 [M14] kultiviert, welches ebenfalls mit 1% L-Glutamine, 10 % FCS und 1 % Penicillin-

Streptomycin versetzt wurde. Keratinozyten wurden in FCS-freiem Epilife Medium [M15] unter Zusatz von HKGS-Kit [M16] kultiviert. LLC-1 wurden in mit Phenolrot versetztem RPMI 1640 [M17] unter Zusatz von 1% L-Glutamin, 10% FCS und 1% Penicillin-Streptomycin kultiviert. Sämtliche Zelllinien wurden in T75ml Zellkulturflaschen [M18] unter sterilen Standardbedingungen im Brutschrank (90% Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂, 37°C) [G1] kultiviert. Der Zustand der Zellen wurde regelmäßig unter dem Umkehrmikroskop [G2] kontrolliert. Um eine gleichmäßige Zellexpansion sicherzustellen wurden die adhärennten Zellen vor Erreichen der Konfluenz mittels Trypsin-EDTA [M19] abgelöst und je nach Zeitraum bis zur nächsten Verwendung im Verhältnis 1:5 bis 1:20 auf 2-4 neue T75ml-Zellkulturflaschen gesplittet. Sofern nicht anders erwähnt, wurden die oben genannten Medien für alle Versuche verwendet.

2.4 WACHSTUMSKURVE

Die Wachstumskurven wurden mit Keratinozyten, B-16, CT-26, LLC-1, HUVECs und TMK-1 durchgeführt, wozu die Zellen entweder in 6-Well-Platten [M20] oder in T25ml-Zellkulturflaschen [M21] plattiert wurden. Die genauen Angaben zur ausplattierten Zellzahl, sowie zur Größe der im jeweiligen Versuch verwendeten Flaschen bzw. Wells, sind dem Ergebnisteil zu entnehmen. Zuerst wurden die Zellen mit 6ml PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, [M22]) gewaschen und mit Hilfe von 2ml Trypsin-EDTA unter sanftem Beklopfen der Zellkulturflasche vom Boden abgelöst. Nach Ablauf der ca. zweiminütigen Inkubationszeit wurde die Ablösereaktion durch Gabe von 1ml des jeweiligen Mediums (mit FCS) gestoppt. Nach kurzem Resuspendieren mittels Pipette und Überführung in ein 15ml Falcon erfolgte ein Waschschriff mit 5ml PBS. Anschließend wurden die Zellsuspensionen bei 1200rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand mit einer Pipette vorsichtig abgesaugt. Nach Resuspendieren in 1ml PBS und Verdünnung mit Trypanblau [M23] (angestrebte Zellzahl pro Quadrant: 30-70) wurden die Zellen mit der Neubauerkammer [M24] gezählt. Aus den vier Zellzahlen wurde der Mittelwert (=MW) ermittelt und im Anschluss daran mit folgender Formel die Zellzahl pro Well berechnet:

Mittelwert $\times 10^4 \times$ Trypanblau-Verdünnungsfaktor = Zellen / ml Zellsuspension

Der Verdünnungsfaktor bei einer 1:10 Verdünnung (10 μ l Zellsuspension auf 90 μ l Trypanblaulösung) ist 10. Im nächsten Schritt wurden die Zellen in Konzentrationen von $2-7,5 \cdot 10^4$ pro 6-Well und in Konzentrationen von $1,2 - 5 \cdot 10^5$ Zellen pro T25-Flasche plattiert.

2.4.1 VERDÜNNUNGSREIHE

Unmittelbar danach wurden die Zellen im entsprechenden Medium für einen Tag im Brutschrank inkubiert, damit sie sich am Boden des Wells oder der Flasche anheften können. Dann wurde das Medium gewechselt und mit unterschiedlichen Elicitinkonzentrationen und Elicitin-Chargen versetzt [M25, M26, M27]. Neben einer Negativkontrolle (ausschließlich Medium ohne Zusatz eines Wirkstoffes) und einer Referenz (Rapamycin 10ng/ml) [M28] wurden verschiedene Elicitin-Quercininkonzentrationen angelegt. Rapamycin ist bekannt als Inhibitor des AKT/mTOR-Pathways (mTOR=mammalian target of rapamycin), dessen proliferationshemmende, antiangiogenetische und translationssupprimierende Wirkung auf die verwendeten Zellen gut bekannt ist und in vielen Experimenten ausführlich untersucht wurde [87; 91]. Pro Gruppe und Zeitpunkt wurden 3 Wells ausgezählt. In späteren Versuchen wurde teilweise auf die niedrigeren Konzentrationen und die 24 Stunden-Werte verzichtet, weil dort keine signifikante Wirkung erwartet wurde. Ebenfalls wurden Versuche mit bei unterschiedlichem pH-Wert aufgereinigten Elicitinen durchgeführt. In einigen Experimenten an B-16 Zellen wurden die Zellen zuerst für 12 Stunden in FCS-freiem Medium inkubiert, um die Zellen unter Stress zu setzen. Daraufhin erfolgte die Elicitinverdünnung in FCS-haltigem Medium. In einem anderen Experiment wurde Elicitin Q in FCS-freiem (0%FCS) oder FCS-reduziertem (1%FCS) Medium auf die Zellen gegeben.

2.4.2 ERNTEN

Beim Ernten der Zellen wurde der Mediumüberstand verworfen und jedes Well mit PBS gewaschen. Jetzt wurde nach ca. zweiminütigem Einwirken von 2ml Trypsin-EDTA pro Well,

jeweils 1ml FCS-haltigen Mediums gegeben, kurz resuspendiert und die Zellsuspension in je ein 15ml messendes Falcon gegeben. Anschließend wurde das Behältnis mit 5ml (bei T25-Flaschen) bzw. 3ml (6-Well) PBS gespült um die Zellen zu entfernen. Die Falcons wurden nun bei 1200rpm 5min lang zentrifugiert und der Überstand daraufhin verworfen. In 1ml PBS resuspendiert wurde die Zellkonzentration mit Hilfe einer Neubauer-Kammer mittels Trypanblauausschluss ermittelt. Durch die Trypanblaufärbung können vitale Zellen von toten Zellen differenziert werden, da nur die toten Zellen den Farbstoff aufnehmen und bläulich aussehen. Hierzu wurden 10µl der geernteten Zellsuspension im Verhältnis 1:2 oder 1:10 mit Trypanblau vermischt. 10µl dieser mit Trypanblau gemischten Zellsuspension wurden anschließend in die Neubauerkammer pipettiert und die vitalen Zellen unter dem Umkehrmikroskop in vier Quadranten ausgezählt. Schließlich wurde die Zellzahl mit der oben genannten Formel berechnet.

2.5 MTT-ASSAY

Der MTT-Assay (=3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dyphenyltetrazolium bromid) (siehe Abbildung 8) ist eine der am öftesten verwendeten Methoden um Cytotoxizität oder die zelluläre Aktivität von Zellen zu messen. Man geht davon aus, dass das membranimpermeable MTT nach erfolgreicher Endozytose von den Succinat-Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien, sowie von den Reduktionsäquivalenten NADH / NADPH vitaler Zellen reduziert wird [92]. Dabei erfolgt ein Farbumschlag des gelben MTT hin zum blauen MTT-Formazan, welches im Anschluss spektrophotometrisch im ELISA-READER [G3] bei 590nm gemessen werden kann.

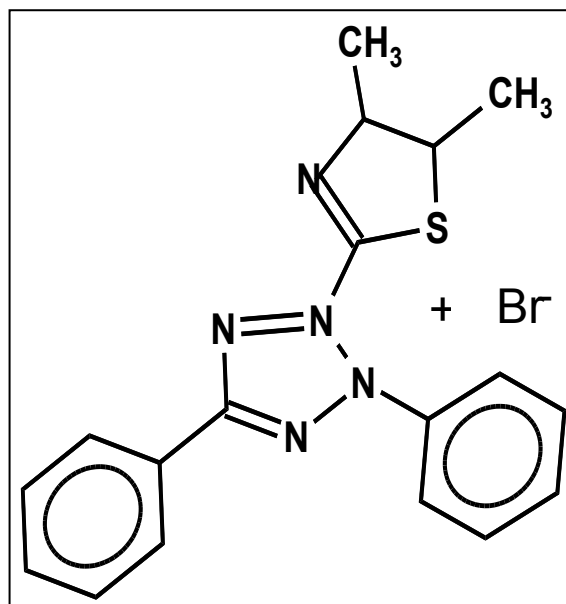


Abbildung 8 Chemische Struktur des MTT im nicht-reduzierten Zustand (gelb). Durch den Kontakt mit mitochondrialen Reduktasen entsteht das blaue, spektrometrisch messbare MTT-Formazan.

Die MTT-Aktivitätsassays [M29] wurden mit 5 unterschiedlichen Zelllinien durchgeführt. Verwendet wurden murine B-16-Melanomzellen (Experimente 2a, 9), CT-26 Kolon-Adenocarcinomzellen (Experimente 2a, 6, 7), LLC-1 (Experiment 8) sowie humane HEK (Experiment 5) und TMK-1 (Experimente 2c, 4). CT-26 und B-16 wurden zusätzlich noch gegen PBS getestet um auszuschließen, dass die erwartete Wirkung nur auf mögliche Verdünnungseffekte des PBS zurückzuführen ist (Experiment 3a). Die Zelllinien wurden dabei, wie bereits oben im Zellproliferationsassay der Zellkultur erwähnt, mit denselben Medien, Wirkstoffverdünnungen und Inkubationszeiten vorkultiviert und geerntet. Beim MTT wurden im Gegensatz zu den Wachstumskurvenexperimenten jedoch 96-Well Platten [M30] verwendet. Am Anfang eines MTT-Versuches wurden je nach Zellreihe zwischen 1000 und 1500 Zellen in 96-Well-Platten ausgesät. Jedes Well enthielt dabei 200µl Medium. Pro Zeitpunkt wurde eine Platte ausplattiert. Die Platten wurden nun im Brutschrank für die Dauer eines Tages inkubiert, damit die Zellen am Boden der Platten anhaften. Die Inkubation erfolgte dabei unter identischen Bedingungen wie bei den Wachstumskurven (siehe Punkt 2.3), um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

Verdünnungsreihe

Nachdem die 0-Werte spektrophotometrisch ermittelt wurden, wurde das Medium der übrigen Platten gewechselt und mit den aufsteigenden Elicitinkonzentrationen versetzt. Wie bei den

Zellkulturversuchen wurden auch hier Rapamycin 10ng/ml, eine Negativkontrolle mit Medium und aufsteigende Elicitin-Quercininkonzentrationen von 5nM, 50nM und 500nM verwendet. In einigen Versuchen wurde zusätzlich noch die Elicitinkonzentration 1000nM eingesetzt.

Messung

Um die Extinktion zu messen, wurden nach jeweils 24, 48, und 72h 40µl der zuvor hergestellten MTT-Lösung in jedes Well hinzugegeben. Nach Gabe des Reagens erfolgte eine 60-minütige Inkubation bei 37°C auf dem Schüttler [G4]. Nach Verstreichen der Inkubationszeit wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und je 100µl DMSO [M31] auf die mittlerweile blau gefärbten Zellen im Well gegeben, um diese zu lysieren und das blaue MTT-Formazan in seiner im Medium gelösten Form spektrometrisch messbar zu machen. Abschließend erfolgte nun die Extinktionsmessung bei 590nm im ELISA Reader und die quantitative Auswertung in der Software Softmax [G5].

2.6 H₂O₂-ASSAY

Die Messung des extrazellulären H₂O₂ erfolgte mit dem Biovision Hydrogen Peroxid Assay Kit [M32]. Hierbei reagiert die Oxired-Probe des Kits in Anwesenheit einer Horse-Radish-Peroxidase (=HRP) mit H₂O₂ zu einem rot gefärbten Stoff, der bei 535nm kolorimetrisch messbar ist. Um auszuschließen, dass das verwendete RPMI Medium die Messungen verfälscht, wurde destilliertes H₂O mit RPMI Medium kreuzgetestet, wobei zu jeder Gruppe aufsteigende H₂O₂ Konzentrationen hinzugefügt wurden. Hierbei traten keine signifikanten Unterschiede auf.

Gewinnung der Zellkulturüberstände:

Wie im Zellkulturversuch wurden B-16 Zellen gesplittet, in T75ml Zellkulturflaschen plattiert (1*10⁶ Zellen) und 24h im Brutschrank unter sterilen Bedingungen inkubiert. Danach erfolgte wieder ein Mediumwechsel mit je 20ml Elicitin Q 5nM, 50nM, 500nM, Rapamycin 10ng/ml und der Negativkontrolle aus RPMI-Medium. Nun wurden pro Verdünnung jeweils 500µl des Zellkulturmediums der Flaschen nach 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 24, 48 und 72h entnommen und

unmittelbar danach für 15min bei 1000 x g zentrifugiert. Kurz darauf wurden vorsichtig jeweils 50µl des Überstandes entnommen und zur späteren Auswertung aliquotiert.

Standardkurve:

Zur Auswertung wurden mit Aqua dest. verdünnte H₂O₂ Standards mit den Konzentrationen 0, 1, 2, 3, 4, 5nmol/Well in 96-Well-Platten pipettiert, wobei jedes Well 50µl enthielt. Die Herstellung des Reaktionsmixes zur H₂O₂ Messung erfolgte nach Herstellerangaben. Jeweils 50µl des Reaktionsmixes wurden zu 50µl Probe bzw. Standard in eine 96-Well-Platte pipettiert, sodass das Gesamtvolumen pro Well 100µl betrug. Nach zehnminütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Extinktion im ELISA-Reader bei 540nm gemessen. Anhand der mit Softmax erstellten Standardkurve wurden die H₂O₂-Konzentrationen im Zellmedium bestimmt.

2.7 WESTERN BLOT

Prinzip:

Mit dem Western Blot Verfahren können Proteine mittels markierten Antikörpern nachgewiesen werden. Die Proteine wurden dazu zuerst durch **Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)** aufgetrennt, danach auf Nitrozellulosefolie [M34] geblottet und schließlich mit Antikörpern detektiert. Die Westernblots wurden mit B-16-Proteinlysaten und spezifischen Antikörpern gegen Caspase-3, p70S6-Kinase und die MAP-Kinasen JNK 1-3, p38 und p44/42 (entspricht ERK1/2) durchgeführt. Folgende Tabelle 2 gibt Auskunft über die verwendeten Antikörper:

Kürzel im Text	Produktbezeichnung	bezogen von
Anti Caspase 3-AK (Maus)	Purified Mouse Anti-Caspase-3 C76920 / Lot 4	Transduction Laboratories, BD Biosciences, Heidelberg, Germany
Phospho p70S6 Kinase-AK	Phospho p70S6 Kinase Thr 389 Antibody, 100µl	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany Cell Signaling Technology®, #9205 S
p70S6 Kinase-AK	p70s6 Kinase Antibody	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany Cell Signaling Technology® #9202
Phospho JNK-AK	Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) Antibody #9251	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany Cell Signaling Technology® #9251
JNK-AK	SAPK/JNK Antibody #9252	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany Cell Signaling Technology® #9252
Phospho p38 MAPK-AK	Phospho p38 MAPK Antibody, 200µl	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany Cell Signaling Technology® #9211S
p38 MAPK-AK	p38 MAPK Antibody, 200µl	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany Cell Signaling Technology® #9211
Phospho p44/42-AK	Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) Antibody , 200µl	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany Cell Signaling Technology® #9101
p44/42-AK	p44/42 MAPK (Erk1/2) Antibody	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Germany Cell Signaling Technology® #9102
Sekundär-AK : Ziege @ Kaninchen HRP	Sekundärantikörper: goat @ rabbit HRP, 200µl Santa Cruz Biotechnology	Fisher Scientific, Pittsburgh, USA

Tabelle 2 Übersicht über die verwendeten Western-Blot-Antikörper und deren Bezugsort

Proteingewinnung:

Zur Proteingewinnung wurden ca. $6 \cdot 10^6$ B-16-Zellen pro Verdünnung in je eine T75-Flaschen plattiert und unter den bei Punkt 2.3 beschriebenen Bedingungen für einen Tag im

Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel mit FCS-freiem Medium mit erneuter 12-stündiger Inkubation im Brutschrank, um die Zellen zu synchronisieren und die Kinasenaktivität zu stoppen. Nun wurde ein erneuter Mediumwechsel mit Q3-500ng/ml, Rapamycin 10ng/ml und einer Kontrolle durchgeführt, wobei das Medium dieses Mal FCS enthielt. Bei den folgenden Schritten wurde konsequent auf Eis gearbeitet. Nach 15-minütigem Einwirken wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen und danach mit jeweils 300µl RIPA-Puffer (enthält 2700µl Ripa-Stammlösung [M35], 300µl Protease-Inhibitor [M36]; 30µl Phosphatase-Inhibitor [M37]) lysiert. Die Proteinlysate wurden anschließend mit Hilfe eines Spatels vom Boden der Flaschen abgekratzt und in 1,5ml Eppendorf Cups überführt. Diese wurden daraufhin für 15min mehrmals gevortext und danach weitere 15min bei 4°C und 13 000rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand aliquotiert worden war, wurde eine Proteinbestimmung der 1:10 bzw. 1:20 verdünnten Proteinlysate mit dem BCA Interchim durchgeführt (Beschreibung siehe Punkt 2.2).

Tag 1 – PAGE

Gießen des Gels:

Zuerst wurden die Glasplatten und die Gummiabdichtung mit 70% Isopropanol [M38] gereinigt. Für die Elektrophorese [93] (Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese, SDS-PAGE) wurde ein 10% Trenngels kurz vor Gebrauch angesetzt, indem folgende Substanzen zusammenpipettiert wurden:

H ₂ O	9,6 ml
Tris 1,5 M ; pH=8,8 [M39]	5,0 ml
10 % SDS [M40]	200 µl
10 % APS [M41]	150 µl
TEMED [M42]	10 µl

Unmittelbar danach wurde das Trenngel in die Kammer zwischen die Glasplatten gegossen und mit etwas Isopropanol überschichtet um eine gerade Oberfläche zu schaffen und eine Austrocknung des Gels zu verhindern. Nach 20 Minuten war das Trenngel durch Polymerisa-

tion ausgehärtet und das Isopropanol wurde abgegossen und mit Aqua dest. gespült. Anschließend wurde 5% Sammelgel wie folgt hergestellt:

H ₂ O	6ml
Tris 0,5M ; pH=6,8	2,5ml
Acrylamid-Mix (40%) [M43]	1,25ml
10% SDS	100µl
10% APS	150µl
TEMED	10µl

Das Sammelgel wurde nun über das Trenngel in die Kammer gegossen. Nach einstündiger Polymerisation des Gels wurde die Kammer mit Laufpuffer mit folgender Zusammensetzung nach obenhin aufgefüllt:

	Für 1000ml
25mM Tris	3,028g
200mM Glycin [M44]	15,014g
0,1% SDS	10ml der 10% SDS-Lösung
H ₂ O dest.	1000ml

Es folgte ein 15-minütiger Vorlauf bei 60 Volt. 20µl der Proben wurden mit 2µl Bromphenolblaulösung gemischt, 10 Minuten bei 95°C gekocht und unmittelbar danach auf Eis gestellt. Das SDS im Puffer überdeckt die Eigenladung der Aminosäuren und denaturiert die Proteine, so dass deren Auftrennung nach Molekulargewicht ermöglicht wird. Nun wurden jeweils 15µl der aufgekochten Proben und 10µl des Rainbow-Markers [M45] in die Geltaschen pipettiert. So lange sich die Proteine im Sammelgel befinden, wird anfangs eine niedrigere Spannung (60V) angelegt, um bei geringerer Laufgeschwindigkeit eine schärfere Proteinauftrennung zu erreichen. Die Spannung wurde im weiteren Verlauf auf 130V erhöht. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die blaue Lauffront das Gelende erreichte. Die Gele wurden in der Blot

Apparatur [G6] bei 100V über eine Stunde durch Blotten in Transferpuffer folgender Zusammensetzung auf eine Nitrozellulose-Membran überführt:

25mM Tris	3,028g
200mM Glycin	15,014g
20% Methanol [M46]	200ml
H ₂ O dest.	1000ml

Schema der Antikörpergabe:

1. Primär-AK gegen phosphorylierte Proteine (gewonnen aus Kaninchen)
2. Gabe des HRP-markierten Sekundär-AK (Ziege @ Kaninchen) → ECL Detektion
3. Strippen (Entfernen des Primär-AK gegen phosphorylierte Proteine)
4. Gabe des zweiten Primärantikörpers (Kaninchen); Bindung sowohl des phosphorylierten als auch des nicht-phosphorylierten Proteins (Panprotein)
5. Gabe des HRP-markierten Sekundär-AK (Ziege @ Kaninchen) bindet Primär-AK gegen Panprotein → ECL Detektion
6. Strippen (Entfernen des Primär-AK gegen Panprotein)
7. Gabe des dritten Primär-AK gegen Aktin (Ziege) als Ladekontrolle
8. Gabe des HRP-markierten Sekundär-AK (Esel @ Ziege) bindet Primär-AK gegen Aktin → ECL Detektion

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren wurde die Nitrozellulosemembran im Anschluss in TBST [M47] mit 5%Milchpulver bei Raumtemperatur für 1h auf dem Schüttler inkubiert. Nach einem fünfminütigen Waschgang mit TBST wurde der jeweilige Primär-AK gegen das phosphorylierte Protein in 5% mit BSA [M48] versetztem TBST auf die Membran gegeben und bei 4°C über Nacht inkubiert.

Tag 2:

Am nächsten Tag wurde die Nitrozellulosemembran zuerst 3 mal 5 Minuten in TBST gewaschen, um nicht gebundene Primär-AK zu entfernen. Danach erfolgte die Gabe des Sekundär-AK in TBST mit 5% Milchpulver (1:3000). Nach einstündiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur erfolgte nach 4 mal 5 minütigem Waschen in TBST die Elektrochemolumineszenz-Detektion (ECL) im Dunkelraum. Dazu wurden jeweils 2ml Detection Reagent 1 und 2 [M49] zu einem Gemisch zusammenpipettiert und jeweils 1ml dieses Gemisches auf jede Nitrozellulosemembran gegeben, wo es eine Minute lang einwirken konnte. Danach wurden die Membranen in Folie verpackt. Durch die Zugabe der ECL-Mischung oxidiert die an den Sekundär-AK gebundene Meerrettichperoxidase (Horseradish peroxidase=HRP) das in der Mischung enthaltene Substrat Peracid. Dadurch entsteht ein luminiszierendes Produkt, welches den in einer Röntgenfilmkassette [G7] auf die Membran gelegte Audiographiefilm [M50] belichtet, so dass dieser im Anschluss entwickelt werden kann (Siehe Abbildung 9). Die Belichtungszeiten lagen zwischen 10min beim AK gegen phosphorylierte Proteine und 10sec beim AK gegen die Ladekontrolle.

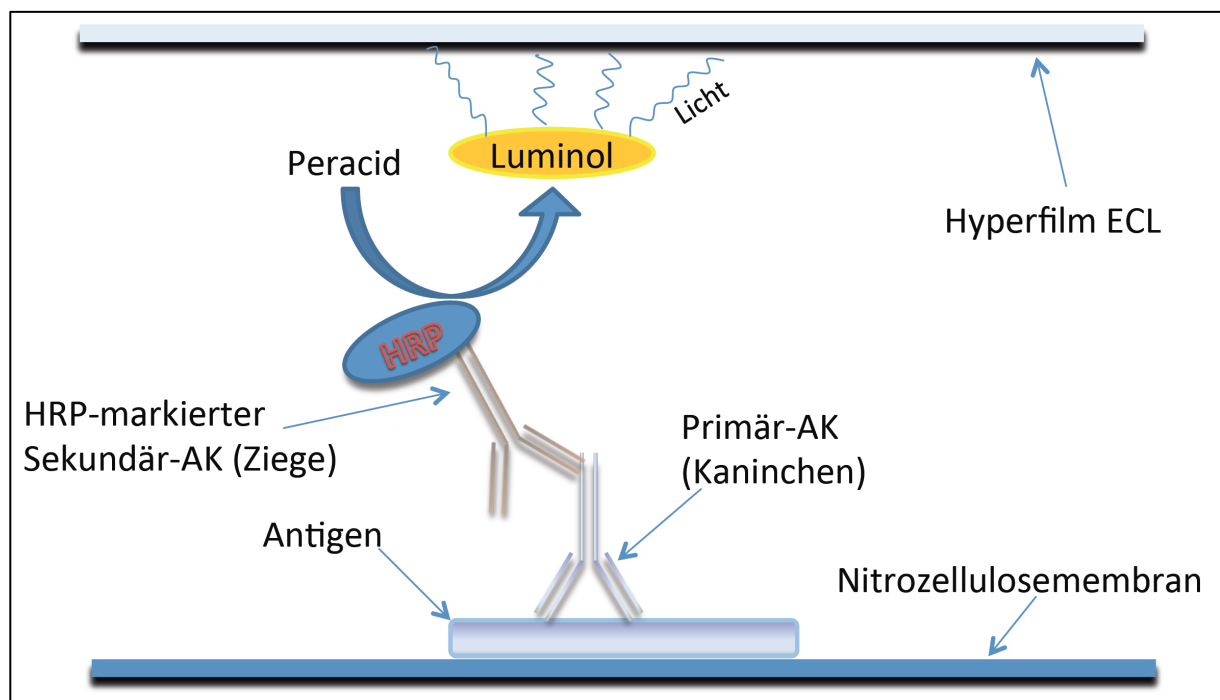


Abbildung 9 Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Westernblots. Durch Primär-AK und primär-AK bindende Sekundär-AK können Antigene spezifisch nachgewiesen werden. Die am Sekundär-AK befindliche Meerrettich-Peroxidase oxidiert Peracid zum luminiszierenden Luminol, welches anschließend für die Belichtung eines Röntgenfilms benutzt wird.

Nach kurzem Waschen mit TBST wurde die Nitrocellulosemembran in einer Stripplösung folgender Zusammensetzung inkubiert, um die gebundenen Antikörper wieder zu entfernen:

62mM Tris	8,57g
2% SDS	20g
H ₂ O ₂	1000ml

Nach drei 5-minütigen Waschgängen und erneutem Blockieren in 50% Milchpulver für 30min erfolgte ein letzter Waschschrift, nachdem nun der zweite in Milchpulver gelöste Primär-AK zugegeben wurde, welcher sich gegen die jeweiligen Panproteine richtet. Nach Inkubation auf dem Schüttler über Nacht erfolgen die Waschschriffe mit anschließender HRP-markierter Sekundärantikörpergabe, ECL Detektion, 20 minütigem Strippen, und 30 minütigem Blockieren in Milchpulver nach demselben Ablauf wie oben geschildert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgt nun die Gabe des Aktin-AK in TBST und 5% Milchpulver mit Inkubation bei 4°C über Nacht. Am nächsten Tag folgten wie vorhin beschrieben drei 5-minütige TBST-Waschgänge, die Gabe von HRP-markiertem Sekundär-AK gegen die Aktin-bindenden Primär-AK, eine einstündige Inkubation in Milchpulver-TBST (1:1000 Blockpuffer) bei Raumtemperatur mit vier fünfminütigen Waschungen und zuletzt die ECL-Detektion (5 Sekunden lang) in der Dunkelkammer.

2.8 FACS-ANALYSE

2.8.1 CFSE – FÄRBUNG

Prinzip

Der Proliferationsnachweis mittels Carboxyfluorescein diacetat succinimidyl ester (=CFSE) (Siehe Abbildung 10) [M51] erfolgte durchflusszytometrisch. CFSE, welches in seiner Diacetat-Form farblos und nichtfluoreszierend ist, diffundiert dabei passiv in die Zellen, wo dessen zwei Acetatgruppen nun von intrazellulär gelegenen Esterasen abgespalten werden und der stark fluoreszierende Farbstoff Carboxyfluorescein succinimidyl ester entsteht, dessen Succinimidylestergruppe anschließend mit intrazellulären Aminen reagiert und so nicht mehr aus der Zelle diffundieren kann.

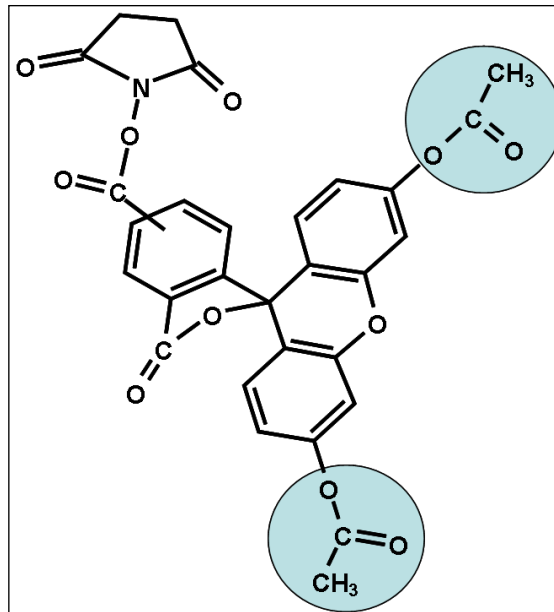


Abbildung 10 Chemische Darstellung von CFSE mit den in blau gefärbten Acetatgruppen. Frei modifiziert nach Invitrogen detection technologies, CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit (C34554)

Die CFSE Färbung wurde mit B-16-Zellen durchgeführt. Wie oben beschrieben wurden die Zellen einer subkonfluenten T75-Flasche geerntet, in einem 50ml Falcon mit PBS gewaschen (um die Zellen von FCS zu säubern) und anschließend gezählt. Die Zellkonzentration wurde, gegebenenfalls durch erneute Zentrifugation (1200rpm, 5min) und Resuspension in PBS, auf $10 \cdot 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Je $3 \cdot 10^6$ Zellen wurden für jede CFSE-Konzentration in ein Falcon überführt. Die gleiche Menge wurde als ungefärbte Zellen bei 4°C inkubiert.

Eine CFSE-Stamm-Lösung wurde in PBS auf Konzentrationen von 0,5µM, 1µM und 2µM verdünnt. Diese wurden nun im Volumenverhältnis 1:1 mit der jeweiligen Zellsuspension zusammen pipettiert und für 15min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte ein Waschschrift in FCS-haltigem Medium, damit das freie CFSE gebunden wird und ungewollte Nachfärbungen vermieden werden. Die Zellen wurden resuspendiert, gezählt und anschließend 30min bei Raumtemperatur inkubiert, damit die Acetatgruppen des CFSE intrazellulär durch Esterasen abgespalten werden können und die Zellen daraufhin gefärbt erscheinen (siehe Abbildung 11).

$0,5 \cdot 10^6$ Zellen jeder CFSE-Konzentration wurden daraufhin auf FACS Röhrchen aufgeteilt und der CFSE-Gehalt der Zellen durchflusszytometrisch kontrolliert. Die Konzentration 2µM erwies sich dabei als am besten geeignet für eine Proliferationsuntersuchung dieser Zellen. Folglich wurden die 2µM gefärbten, sowie die ungefärbten Zellen nach einer 1-stündigen

Inkubation auf Eis, die der Synchronisation des Zellzyklus diene, in Konzentrationen von 120 000 Zellen pro T25-Zellkulturflasche in RPMI-1640-Zellkulturmedium plattiert. 24h später erfolgte ein Mediumwechsel mit den Verdünnungen Kontrolle, Rapamycin 5ng/ml und Elicitin Q3 in den Konzentrationen 5, 50 und 500ng/ml.

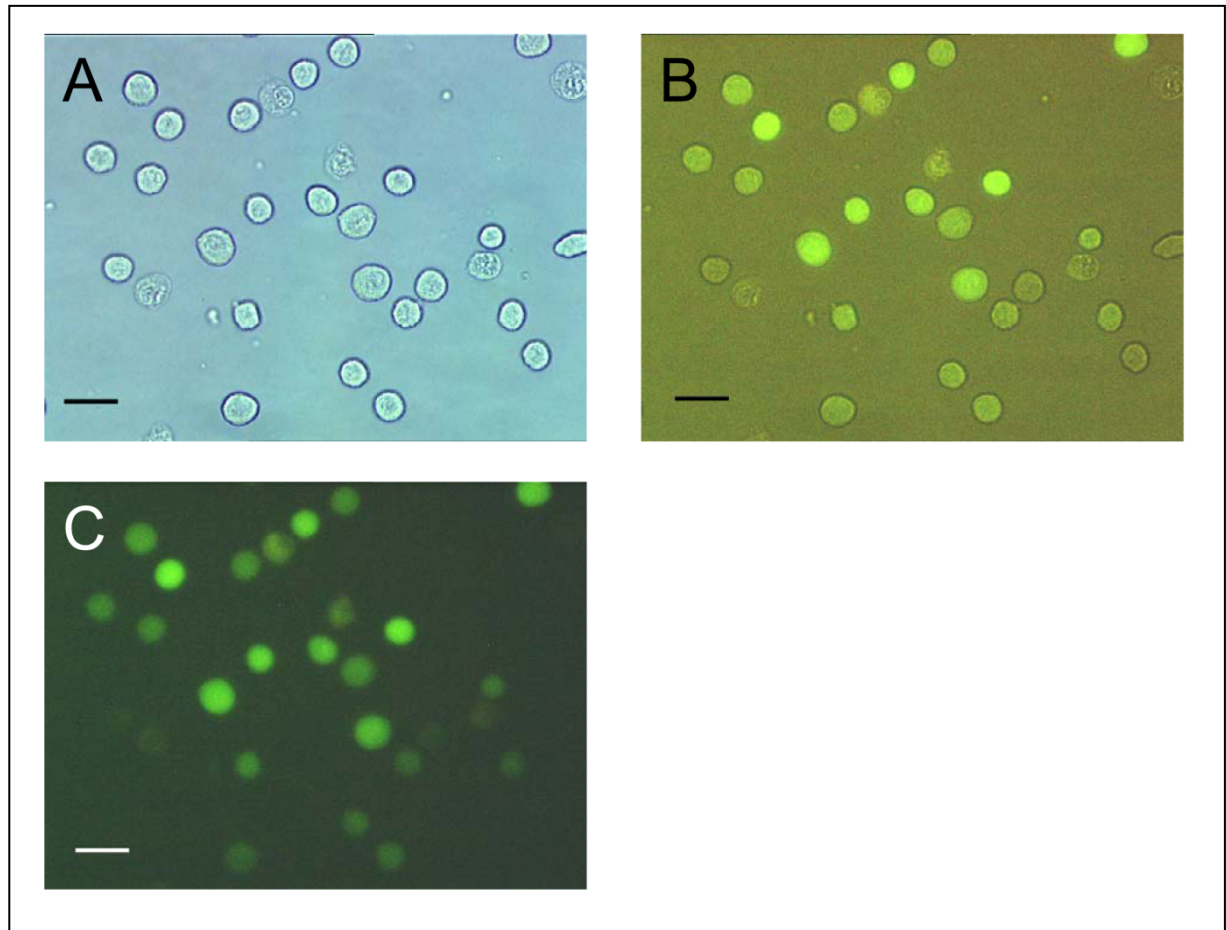


Abbildung 11 Fotos der CFSE-gefärbten B-16 nach dem Abtrypsinieren unter dem Durchlichtmikroskop. Die Balkengröße entspricht 20 μm .

A zeigt ein normales Hellfeldbild ohne Fluoreszenz

B zeigt Fluoreszenz mit gleichzeitigem Durchlicht

C zeigt eine ausschließlich mit Fluoreszenz erstellte Aufnahme.

2.8.2 7AAD-APOPTOSE-ASSAY

Der Apoptosemarker 7AAD [M52] wurde aus zwei verschiedenen Gründen verwendet. Zum einen sollten bei der CFSE-Untersuchung nur die vitalen Zellen beurteilt werden. Die apoptotischen Zellen können am FACS-Gerät [G8] mittels 7AAD ausgeschlossen werden. Zum anderen diente 7AAD als unabhängiger Wert für Apoptose unter Elicitineinfluss.

Die CFSE gefärbten B-16-Zellen (Durchführung siehe Punkt 2.8.1) und die ungefärbten B-16 wurden nach 72h Inkubation im Brutschrank wie oben beschrieben geerntet, in einem mit PBS gefüllten 15ml Falcon zentrifugiert, gezählt und in Konzentrationen von $0,5 \cdot 10^6$ Zellen in 100µl PBS auf FACS-Röhrchen verteilt. Nach der Zugabe von 10µl 7-Amino-Actinomycin D (=7AAD) erfolgte eine 10-minütige Inkubation im Kühlschrank. Nun folgten 4 Waschgänge mit je 1ml MACS-Puffer (hergestellt aus 2,5g BSA und 0,37g EDTA [53] in 500ml PBS gelöst), anschließender Zentrifugation und vorsichtigem Ableeren des Überstandes. Im Anschluss daran erfolgte die Auswertung am FACS-Gerät.

Auswertung am FACS-Gerät:

Zuerst wurde ein so genanntes physikalisches Gate um die größte Population der vermuteten Zellen gezogen und als Region 1 definiert. Die Zellen wurden dabei mittels eines Laserstrahls im Forward Scatter hinsichtlich ihrer Größe und im Side Scatter hinsichtlich ihrer Granularität beurteilt. Im nächsten Schritt erfolgte der Ausschluss apoptotischer, d.h. 7AAD positiver Zellen, in dem die vitalen 7AAD negativen Zellen in einem weiteren Gate als Region 2 definiert wurden. Schließlich wurde ein Histogramm aus Region 1 + Region 2 erstellt in dem ausschließlich die vitalen, CFSE-gefärbten Zellen beurteilt werden konnten.

2.9 DATENANALYSE

Die Ergebnisse aller statistischen Berechnungen wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels studentischen t-tests für unabhängige Stichproben ermittelt. Falls der in der Literatur oftmals vorkommende t-test nicht durchführbar war, wurde der Mann-Whitney-Rank-Sum-Test angewendet.

Als signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $P < 0,05$ eingestuft, als hoch signifikant bezeichnet wurden Irrtumswahrscheinlichkeiten von $P < 0,001$. Sämtliche Berechnungen wurden mit SPSS SigmaPlot 8.0 (SPSS®, Chicago, Illinois, USA) durchgeführt. Sofern

möglich wurden die signifikanten Graphen mit einem Sternchen (bzw. 2 Sternchen für hoch signifikante Werte) direkt in den Abbildungen markiert. Falls die unterschiedlichen Werte in den Diagrammen zu nah zusammenlagen, wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit Tabellen mit den zugehörigen Signifikanzkennzeichnungen erstellt.

2.10 VERWENDETE SOFTWARE:

Die Abbildungen chemischer Formeln und Moleküle wurden mit der Freeware C-Design 3.0 f [G9] erstellt. Die Grafische Darstellung der Photographien und Grafen erfolgte mit Adobe Photoshop CS 3 [G10]. Die Analyse am FACS erfolgte mit der Software Cellquest [G11], während die anschließende Verarbeitung der gewonnenen FACS-Daten mit FlowJo [G12] durchgeführt wurde.

3. ERGEBNISSE

3.1 VORVERSUCHE ZUR ETABLIERUNG DER MTT-METHODE (EXPERIMENT 1)

Um die Methode des MTTs für die jeweiligen Zelllinien zu etablieren wurden anfangs Zytotoxizitätsmessungen mit Verdünnungsreihen von Azathioprin in den Konzentration 1, 10, 50, 100, 500 μ M und Prograf in den Konzentrationen 1, 10, 100, 1000ng/ml an B-16 und TMK-Zellen durchgeführt (Abbildung 12), wobei Rapamycin als Referenz verwendet wurde. Nach 48h zeigte sich ein Trend für die Wirksamkeit von Azathioprin an beiden Zelllinien, der sich nach 72h noch deutlicher manifestierte. Im Gegensatz dazu zeigte Prograf allerdings keinen signifikanten Effekt.

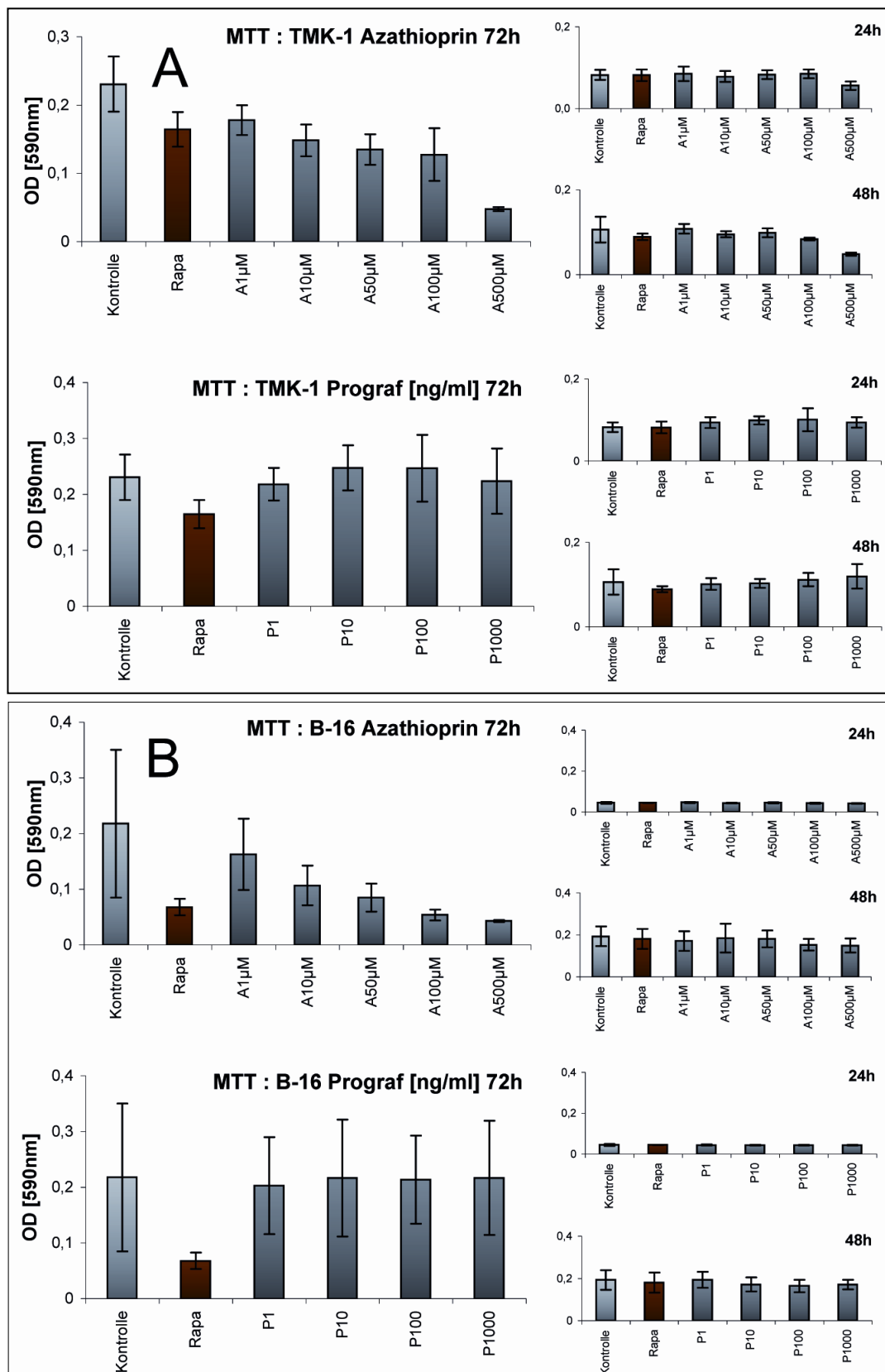


Abbildung 12 Grafische Darstellung der MTTs von Azathioprin und Prograf an TMK-1 (A) und B-16 (B). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden Prograf und Azathioprin jeweils in verschiedenen Diagrammen präsentiert. Dargestellt ist die bei 590nm gemessene optische Dichte zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten (t =

24h, 48h und 72h) \pm SD. Je Versuchsserie wurden 8 Ansätze pro Gruppe gemessen und daraus der Mittelwert ermittelt. Sowohl bei den verwendeten B-16 als auch bei den TMK-1 Zellen, zeigt sich nach 72h eine dosisabhängige Reduktion der optischen Dichte.

3.2 VERSUCHE MIT ELICITINEN AUS EINEM AKTIVEN *P. QUERCINA* UND *P. CITRICOLA* ISOLAT

Zuerst wurde mit Hilfe des Zytotoxizitätsassays MTT ein Screening mit den Zelllinien CT-26, B-16 und TMK-1 durchgeführt, da bei der ersten Aufreinigung keine quantitativ suffiziente Proteinmenge für umfangreichere Experimente verfügbar war. Darüber hinaus wurden Wachstumskurven mit CT-26, primären humanen Keratinozyten und HUVECs erstellt, wobei sowohl Quercinin als auch Citricolin aus aktiven Isolaten verwendet wurde (im Folgenden als QI und CI bezeichnet).

3.2.1 B-16 ZELLEN, EXPERIMENT 2A

Bei den murinen B-16-Zellen zeigte sich nach 48h eine deutliche signifikante Zellzahl-senkung von über 90 %, die sowohl bei CI als auch bei QI festgestellt wurde. Dieser Effekt war sowohl in der Wachstumskurve (Abbildung 13) als auch bei der optischen Kontrolle im Durchlichtmikroskop (Abbildung 14) zu beobachten. Dabei waren die beiden eingesetzten Konzentrationen von 50 und 500ng/ml in etwa gleich wirksam.

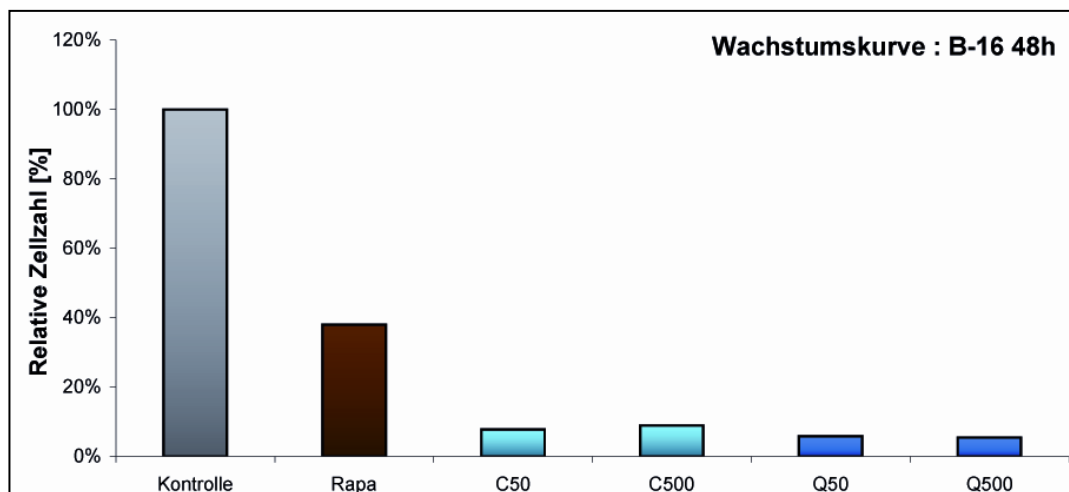


Abbildung 13 Graphische Darstellung von Experiment 2a: Zellproliferations-Assays für B-16 mit QI und CI. Dargestellt sind die relativen Zellzahlen zur jeweiligen Kontrollgruppe nach 48h. Sowohl in den CI als auch in den QI-wells zeigt sich eine Reduktion der relativen Zellzahl auf unter 20%. Da nur ein Ansatz gezählt wurde, sind keine Fehlerbalken dargestellt.

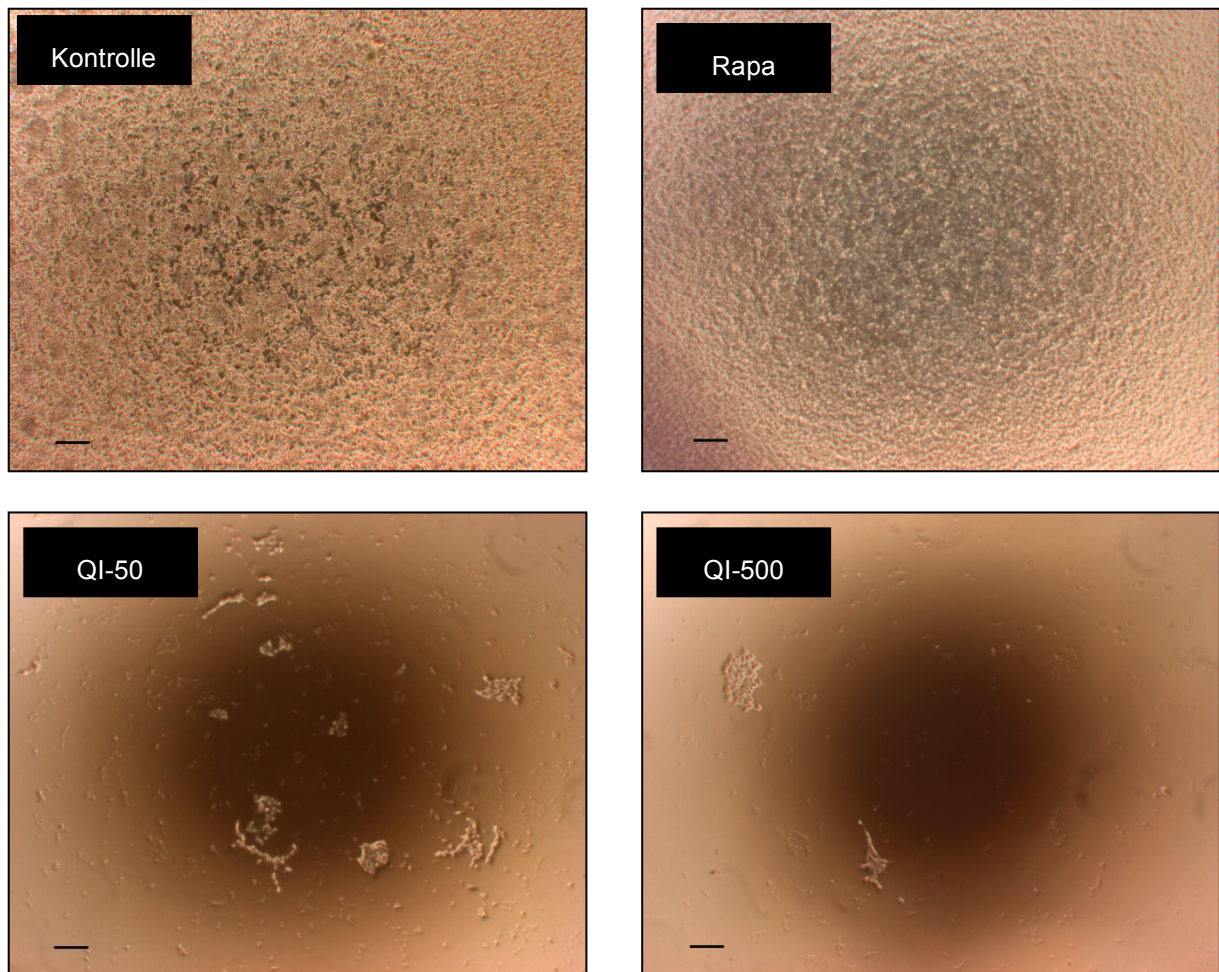


Abbildung 14 Fotografien der B-16 Zellen unter dem Durchlichtmikroskop. Mikroskopisch zeigt sich eine deutlich reduzierte Zellzahl in den QI-wells. Die dargestellte Balkenlänge entspricht 200 μm .

Während die optische Kontrolle des CI Wells mit B-16 keinerlei Indiz für eine Zellyse ergab, war die Zellzahl in der unmittelbar daraufhin ausgezählten Wachstumskurve stark erniedrigt. Ursächlich dafür könnte einerseits technisches Versagen sein. Allem Anschein nach, ist es jedoch andererseits wahrscheinlicher, dass die Zellen bereits so weit vorgeschädigt waren, dass sie einen Teil der anschließenden Weiterbehandlung, wie beispielsweise die Zentrifugation, nicht überlebt haben. Der mit B-16 durchgeführte MTT zeigte, dass CI keine Wirkung auf die Zellaktivität hatte (Abbildung 15). QI zeigt hier in der höchsten Konzentration von 500ng/ml jedoch eine starke, hoch signifikante Senkung der Zellaktivität um -54%, welche die Wirkung der Referenz Rapamycin (-36%) sogar übertraf.

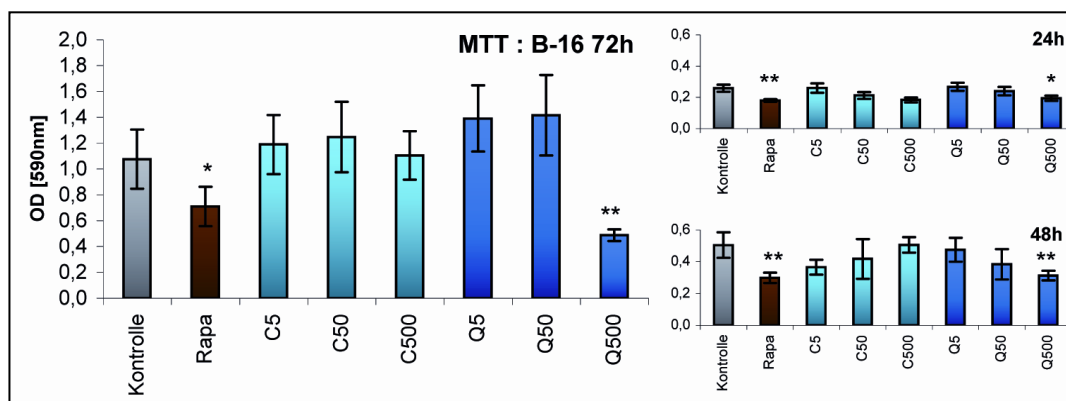


Abbildung 15 Grafische Darstellung der MTTs von CI und QI an B-16. Dargestellt ist die bei 590nm gemessene optische Dichte zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten ($t = 24h, 48h$ und $72h$) \pm SD. Während CI keinen Einfluss auf die Zellaktivität zeigt, waren bei QI in der höchsten Konzentration signifikante bis hochsignifikante Aktivitätssenkungen zu allen Zeitpunkten messbar. Je Versuchsserie wurden 12 Ansätze pro Gruppe gemessen und daraus der Mittelwert ermittelt. * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$.

3.2.2. CT-26 ZELLEN, EXPERIMENT 2B UND 2B'

Bei den CT-26 Zellen offenbarte sich sowohl bezüglich der Zellzahl, als auch hinsichtlich der Zellaktivität ein ähnliches Bild. Nach 72 Stunden sank die Zellzahl in der höchsten QI Konzentration um 62% (Abbildung 16).

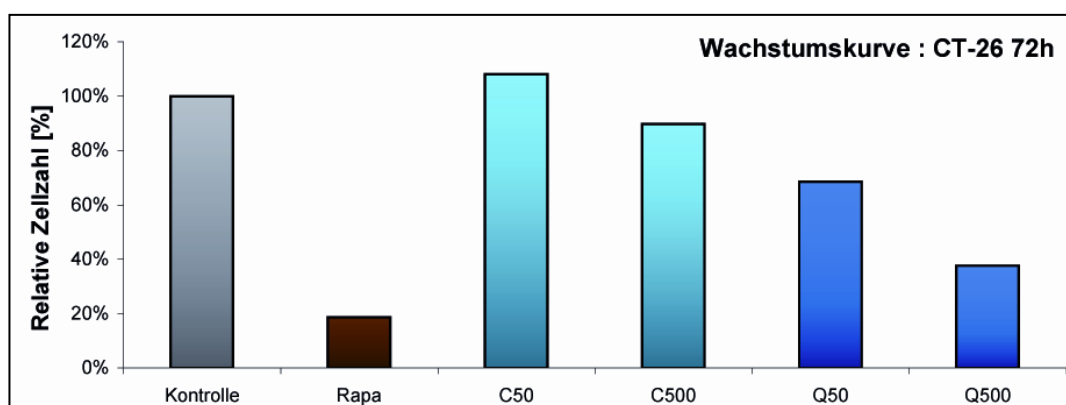


Abbildung 16 Graphische Darstellung der Zellproliferations-Assays 2b für CT-26 mit QI und CI. Dargestellt sind die relativen Zellzahlen zur jeweiligen Kontrollgruppe nach 72h. Es zeigte sich eine Reduktion der relativen Zellzahl um 62% in der höchsten QI-Konzentration. Da nur ein Ansatz gezählt wurde, sind keine Fehlerbalken dargestellt.

Im MTT sank die Zellaktivität der QI-500 Probe hochsignifikant um 53%, wie in Abbildung 17 ersichtlich. Die beiden eingesetzten, niedrigeren QI Konzentrationen von 5 und 50ng/ml zeigten nach 72h einen hochsignifikanten Effekt nach oben.

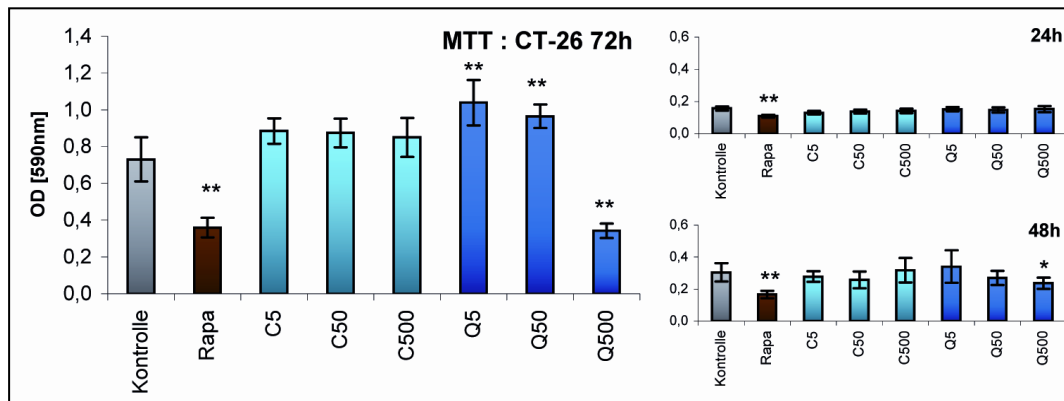


Abbildung 17 Grafische Darstellung des MTT aus Experiment 2b von CI und QI (pH bei Aufreinigung = 6,8) an CT-26. Dargestellt ist die bei 590nm gemessene optische Dichte zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten ($t = 24h, 48h$ und $72h$) \pm SD. Nach 48h und 72h zeigte sich eine hochsignifikante Aktivitätsminderung bei der höchsten QI Konzentration. Je Versuchsserie wurden 12 Ansätze pro Gruppe gemessen und daraus der Mittelwert ermittelt. * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$.

CI zeigte weder bezüglich Zellzahl noch Zellaktivität signifikante Änderungen, während Rapamycin stets signifikante und hochsignifikante Werte zeigte. Der Versuch mit CI wurde daraufhin noch einmal durchgeführt, um das Ergebnis zu verifizieren (Abbildung 18). Da die im ersten Versuch erreichte Zellzahlsenkung nach 72h in den Folgeexperimenten nicht reproduzierbar war, ist davon auszugehen, dass die signifikante Zellzahlsenkung im ersten Versuch eher auf technisches Versagen, wie beispielsweise ein hoher Verdünnungsfaktor mit PBS zurückzuführen ist.

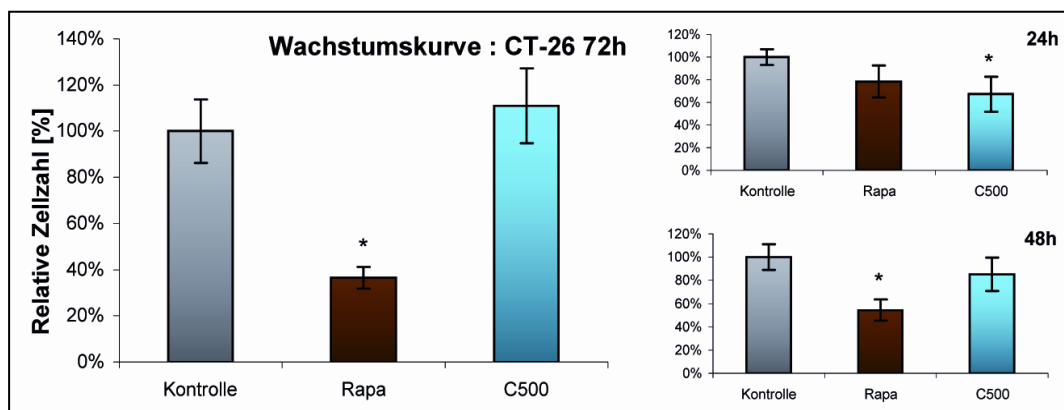


Abbildung 18 Grafische Darstellung des Zellproliferationsassays 2b' von CI an CT-26. Dargestellt sind die relativen Zellzahlen prozentual zur jeweiligen Kontrollgruppe zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten ($t = 24h, 48h$ und $72h$) \pm SD. Nach 72h zeigte sich keine signifikante Zellzahländerung in den CI-wells. Es wurden jeweils Zellzahlbestimmungen pro Gruppe durchgeführt und daraus der Mittelwert ermittelt. * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$.

3.2.3 TMK-1, EXPERIMENT 2C

Der durchgeführte MTT an TMK-Zellen zeigte eine leichte Erhöhung der Zellaktivität in den niedrigeren Konzentration 5 und 50ng/ml, während sich die QI-500-Werte nicht veränderten (siehe

Abbildung 19). Auch bei TMK-1 blieb bei Exposition der Zellen mit CI eine signifikante Reaktion aus. Die nachfolgenden Experimente wurden daraufhin ausnahmslos mit Quercinin durchgeführt.

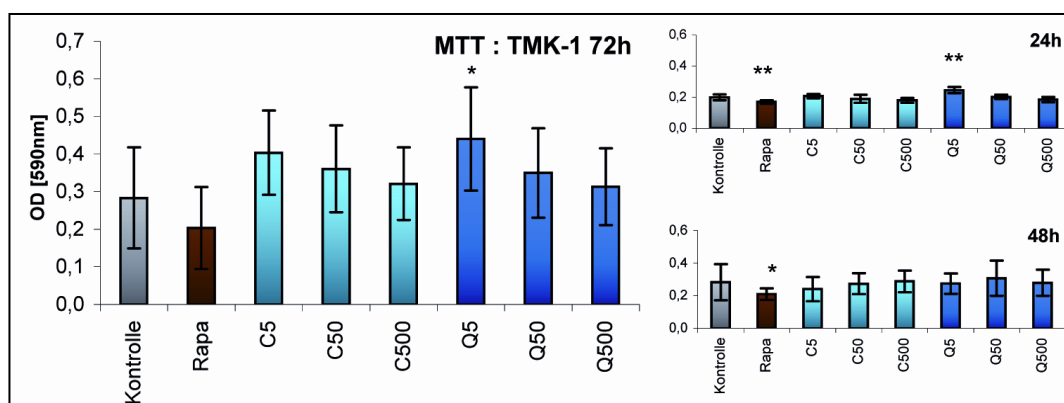


Abbildung 19 Grafische Darstellung des MTT von CI und QI an TMK-1 in Experiment 2a. Dargestellt ist die bei 590nm gemessene optische Dichte zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten (t = 24h, 48h und 72h) \pm SD. Je Versuchsserie wurden 12 Ansätze pro Gruppe gemessen und daraus der Mittelwert ermittelt. * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$.

Im Zuge des Screenings wurden auch Tests mit „normalen“, nicht-entarteten Zellen wie HUVECs und Keratinozyten durchgeführt. Hierbei wurden Chargen des Quercinin aus aktivem Isolat aus Gründen mangelnder Verfügbarkeit in den Konzentrationen 4, 40 und 400ng/ml verwendet.

3.2.4 KREUZTESTUNG MIT PBS, EXPERIMENT 3A

Um zu beweisen, dass die beobachtete Wirkung tatsächlich vom Elicitin herrührte und nicht durch das im Elicitinlyophilisat enthaltene PBS ausgelöst wurde, wurden bei B-16 und CT-26 erneut MTTs mit einer PBS-Kontrolle durchgeführt. Hierbei wurde die zu Elicitin-Q äquivalente Volumenmenge PBS zur Kontrolle zugegeben. Wie erwartet zeigte sich bei der Kontrolle mit PBS keine Änderung, jedoch bei QI-500 und Rapa (siehe Abbildung 20). Seltsamerweise zeigte ein PBS Well bei CT-26 auch signifikant aktivitätssenkende Werte, obwohl in diesem Well gar kein Wirkstoff enthalten war. Da diese Wells jedoch in ihrer

Zusammensetzung den anderen PBS-Wellen genau entsprachen, ist wahrscheinlich von einem technischen Fehler auszugehen.

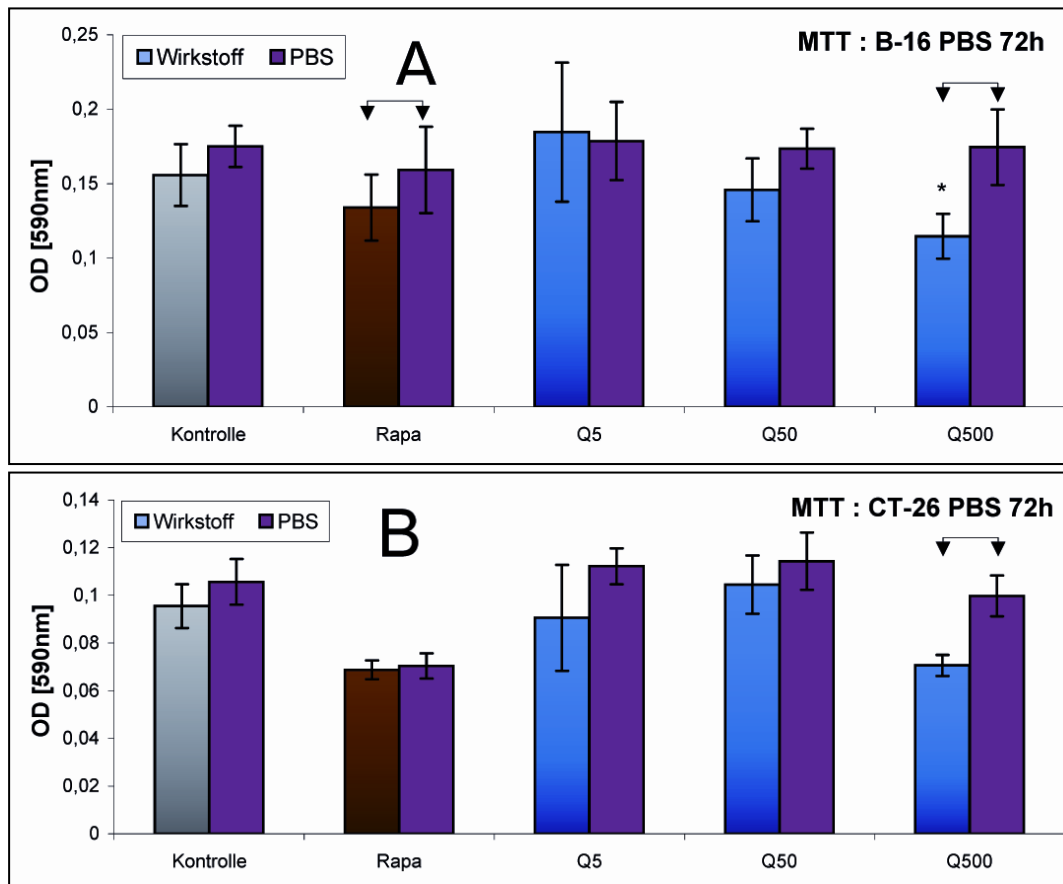


Abbildung 20 Grafische Darstellung des Experimentes 3a: MTT von CI und QI an B-16 (A) und CT-26 (B). Dargestellt ist die bei 590nm gemessene optische Dichte nach 72h \pm SD. Es zeigt sich eine Aktivitätsminderung gegenüber der PBS-Kontrolle bei Rapamycin und QI. Je Versuchsserie wurden 12 Ansätze pro Gruppe gemessen und daraus der Mittelwert ermittelt. * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$. Die eingezeichneten Pfeile kennzeichnen einen signifikanten Unterschied zur PBS-Gruppe mit $P < 0,05$.

3.2.5 HUVECs, EXPERIMENT 3B

Bei einer Zellzahlbestimmung nach 48h zeigte sich keine signifikante Senkung der Zellzahl bei Rapa und QI (siehe Abbildung 21).

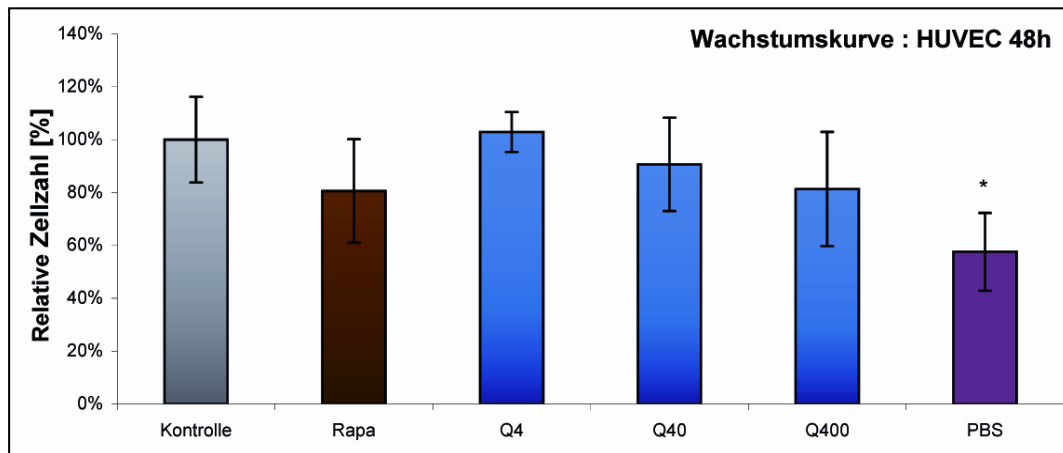


Abbildung 21 Graphische Darstellung von Experiment 3b: Zellproliferations-Assays für HUVECs. Aus Gründen mangelnder Verfügbarkeit wurden die Quercinindosen 4, 40 und 400ng/ml verwendet. Dargestellt sind die relativen Zellzahlen zur Kontrollgruppe nach 48h. Es zeigte sich keine signifikante Zellzahlreduktion bei Rapamycin oder QI. Pro Gruppe wurden 3 Ansätze gemessen und daraus der Mittelwert ermittelt. * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$.

3.2.6 KERATINOZYTEN, EXPERIMENT 3C

Die Untersuchung von QI an den humanen primären Keratinozyten zeigte nach 48h optische Anzeichen eines Zelltodes. Bei der anschließenden Zellzahlbestimmung war jedoch nur bei Rapamycin eine gegenüber der Kontrolle signifikant verringerte Zellzahl erkennbar (-66%).

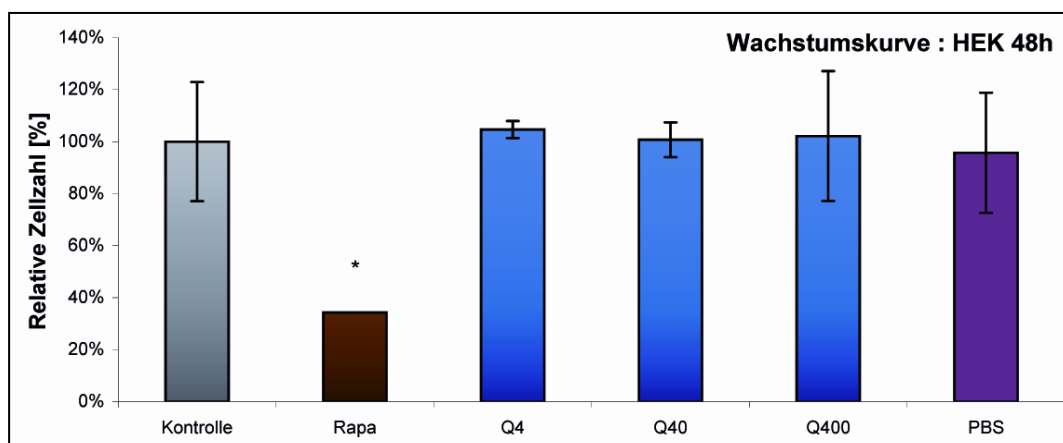


Abbildung 22 Graphische Darstellung des Experimentes 3c: Zellproliferations-Assays für HEK. Aus Gründen mangelnder Verfügbarkeit wurden die QI-Dosen 4, 40 und 400ng/ml verwendet. Dargestellt sind die relativen Zellzahlen zur Kontrollgruppe nach 48h. Pro Gruppe wurden 3 Ansätze gemessen und daraus der Mittelwert ermittelt. Da bei Rapamycin dreimal die gleichen Werte gemessen wurden, ist kein Fehlerbalken dargestellt. * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$.

3.2.7 ZUSAMMENFASSUNG DER SCREENINGEXPERIMENTE

Aus den Screening-Experimenten mit unterschiedlichen Zelllinien wurde folgendes Fazit gezogen:

- B-16: Aus einem aktiven Isolat gewonnenes QI zeigte den stärksten Effekt bei B-16. QI-500 und QI-50 übertrafen bei 72h sogar die Wirkung von Rapa (Experiment 2a). Im MTT zeigte sich nach 72h eine signifikante Senkung in der höchsten Quercinin-konzentration.
- CT-26: Im MTT zeigte sich bei QI-500 nach 72h eine signifikante Aktivitätsminde-rung um -54 % gegenüber der Kontrolle (Experiment 2b). Auch die Zellzahl sank nach bei QI-500 um -62% und bei QI-50 um -32% gegenüber der Kontrolle. CT-26 sind dabei weniger sensitive Zellen als B-16. Wenn Quercinin bei CT-26 wirkt, ist die Aus-sage „besser“ als bei ausschließlicher Verwendung der B-16.
- TMK-1 zeigte im ersten Screening keine signifikant gesenkten Werte im MTT (Experiment 2c). Da die Methodik im Umgang mit TMK-1 im Labor gut etabliert wurde und TMK-1 als humane Tumorzellen ein interessantes Therapietarget darstellen würde, wurden weitere Versuche geplant.
- HEK zeigten sich trotz optischer Zelltodzeichen keine signifikanten Unterschiede. Ebenso waren bei HUVECs (Experiment 3b) keine signifikanten Werte zu beobach-ten.

Die Ergebnisse von Quercinin waren vielversprechend und gaben Anlass, diesen Stoff syste-matisch zu erforschen und die bisherigen Ergebnisse statistisch abzusichern. Um parallel dazu zu untersuchen, ob Quercinin auch bei Säugetierzellen apoptoseinduzierende Wirkung hat, die bei einigen Pflanzenspezies bereits ausführlich beschrieben wurde, wurden zur Untersuchung der Signaltransduktion Westernblots mit Anti-Caspase-3-AK und Antikörpern gegen die MAP-Kinasen JNK, p38 und p44/42 mit B-16-Zelllysat durchgeführt.

Außerdem wurde der Elicatineinfluss auf das Proliferationsverhalten mittels CFSE sowie auf das Apoptoseverhalten mittels 7AAD durchflusszytometrisch im FACS untersucht. Versuche mit LLC-1 wurden durchgeführt (Experiment 8), um bei einer positiven Quercininwirkung die fluoreszenz-markierten, dualcolor gefärbten LLC-1-DC Zellen mit live cell imaging sichtbar

machen zu können [94]. Es ist dabei möglich, die rot gefärbten Histone unter dem Fluoreszenzmikroskop hinsichtlich Apoptose und Mitose zu beurteilen. Lungenkrebs ist außerdem als weltweit häufigste Krebsform bei Männern und zweithäufigste bei Frauen [2] von eminenter klinischer Bedeutung.

3.3 VERSUCHE MIT ELICITINEN AUS EINEM FÜR ZWEI JAHRE GELAGERTEN P. QUERCINA ISOLAT

3.3.1 VERSUCHE MIT ELICITINMISCHISOLAT (SAURE UND BASISCHE ELICITINE) AUS EINEM PHYTOPHTORA QUERCINA KULTURFILTRAT

Mit Erhalt der neuen Quercinin Chargen AF3 1.1, AF3 1.2 und AF3 2 erfolgte nun die abermalige Testung an den bereits im Screeningversuch (Experimente 2a-c und 3a-c) verwendeten Zellen. Durch ein neues, effizienteres Aufreinigungsverfahren war es möglich, Quercinine in einer höheren Konzentration zu gewinnen und den Stoff damit systematischer zu untersuchen. In den folgenden Experimenten 4 bis Experiment 15 wurden die Quercinine nun bei einem pH-Wert von 3 aufgereinigt und entsprechen somit dem in Experimenten 16, 17 und 18 verwendeten Q3.

3.3.1.1 TMK-1, Experiment 4

In der Wachstumskurve zeigte sich nach 72 Stunden eine signifikante Zellzahlsenkung in der höchsten Quercinin-Konzentration um 20% ($p=0,047$) wenn auch Rapamycin im Vergleich zu Q500 signifikant besser in seiner Wirkung ($p=0,022$) bleibt (siehe Abbildung 23 A). Im MTT war sowohl nach 24h als auch nach 48h eine Erhöhung der mitochondrialen Aktivität in allen Quercininkonzentrationen sowie bei Rapamycin zu beobachten. Nach 72h war ausschließlich die Aktivität der Rapa-Probe gesenkt, nicht jedoch die der verschiedenen Q (siehe Abbildung 23 B). Die mitochondriale Aktivität pro Einzelzelle (bestimmt aus der gemessenen Gesamt-OD geteilt durch die Anzahl der in der Wachstumskurve bestimmten Zellen) fiel im zeitlichen Verlauf konstant ab, jedoch blieben sowohl Rapa als auch Q gegenüber der Kontrolle erhöht (siehe Abbildung 23 C).

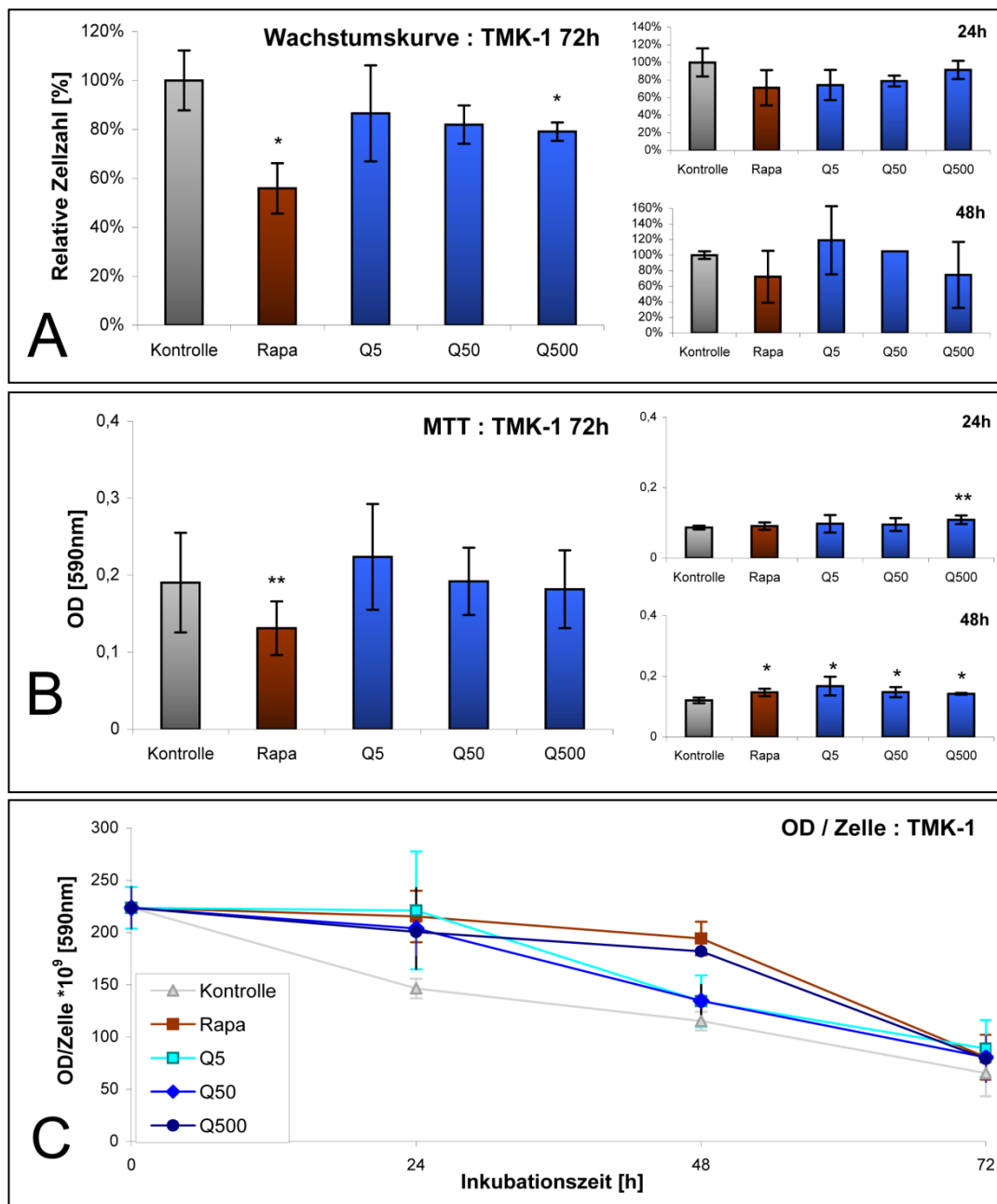


Abbildung 23 Grafische Darstellung von Experiment 4, TMK-1 Zellen zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten ($t = 24h, 48h, 72h \pm SD$).

A Stellt die relativen Zellzahlen prozentual zur Kontrolle dar. Es zeigt sich eine signifikante Zellzahlensenkung bei Q500 nach 72h.

B zeigt die bei 590nm gemessene optische Dichte. Nach 48h zeigt sich eine kurzfristige Aktivitätserhöhung in allen Wells.

C veranschaulicht den zeitlichen Verlauf der bei 590nm gemessenen optischen Dichte / absolute Zellzahl. Dies entspricht der mitochondrialen Aktivität pro Einzelzelle.

* kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$.

3.3.1.2 Keratinozyten, Experiment 5

Dieser Versuch diente dem erneuten Vergleich zwischen entarteten Melanomzellen und nicht entarteten Keratinozyten. Die Keratinozyten dienten dabei sozusagen als „Modell“ für eine gesunde Zelle ohne Krebs. Im Idealfall sollte das Antitumormedikament diese nicht-entarteten Zellen nicht oder zumindest weniger stark schädigen als Tumorzellen, welche sich oft durch eine aberrante Signaltransduktion, einen auf Milchsäuregärung umgestellten Stoffwechsel und ROS-Produktion von „normalen“ Zellen unterscheiden. Während Rapamycin nun zu allen Zeitpunkten deutlich signifikante Zellzahlminderungen zeigte, stieg die Zellzahl der Quercininproben ab der 48h Messung sogar an und erreichte nach 72h signifikant erhöhte Werte für Q500 (siehe Abbildung 24 A). Der Rückgang der Kontrollzellzahlen beim 72h Wert erklärt sich damit, dass die Zellen wegen Überfüllung im konfluenten Well abschwimmen. Im MTT waren die Rapa-Werte zu allen Zeitpunkten signifikant gesenkt, während Q teilweise signifikant erhöhte Messwerte zeigte (Abbildung 24 B). In der errechneten mitochondrialen Aktivität pro Einzelzelle zeigte Rapa gegenüber der Kontrolle stets signifikant erhöhte Werte, während bei Quercinin bei 48h und 72h Stunden erniedrigte Werte zu beobachten waren (Abbildung 24 C).

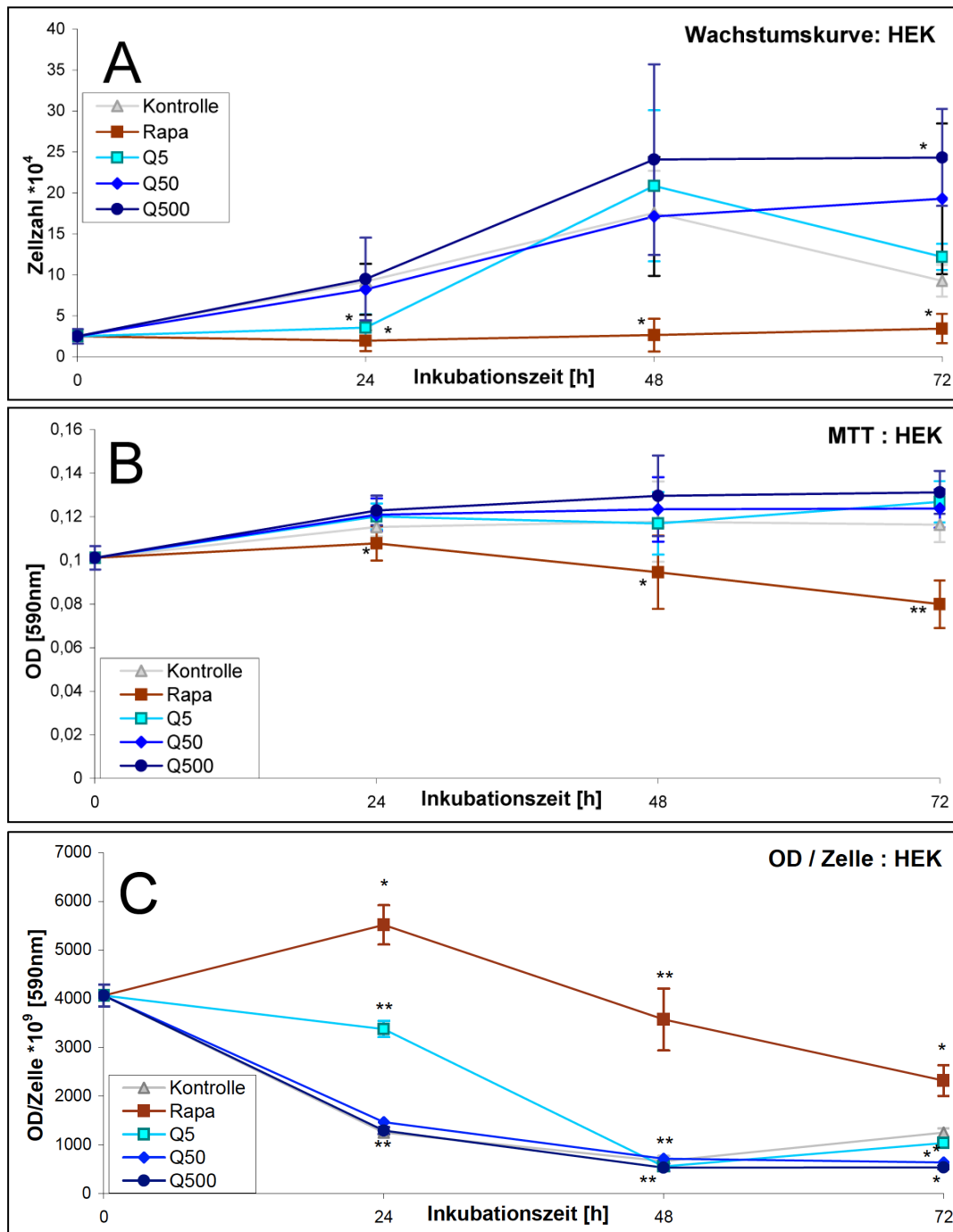


Abbildung 24 Grafische Darstellung von Experiment 5, HEK Zellen zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten ($t = 24\text{h}, 48\text{h}, 72\text{h} \pm \text{SD}$). * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$.

A Stellt die absolut gemessenen Zellzahlen der unterschiedlichen Gruppen dar.

B zeigt die bei 590nm gemessene optische Dichte.

C veranschaulicht den zeitlichen Verlauf der bei 590nm gemessenen optischen Dichte / absolute Zellzahl. Dies entspricht der mitochondrialen Aktivität pro Einzelzelle. Nach 48h und 72h sind signifikant erniedrigte Werte bei Quercinin messbar.

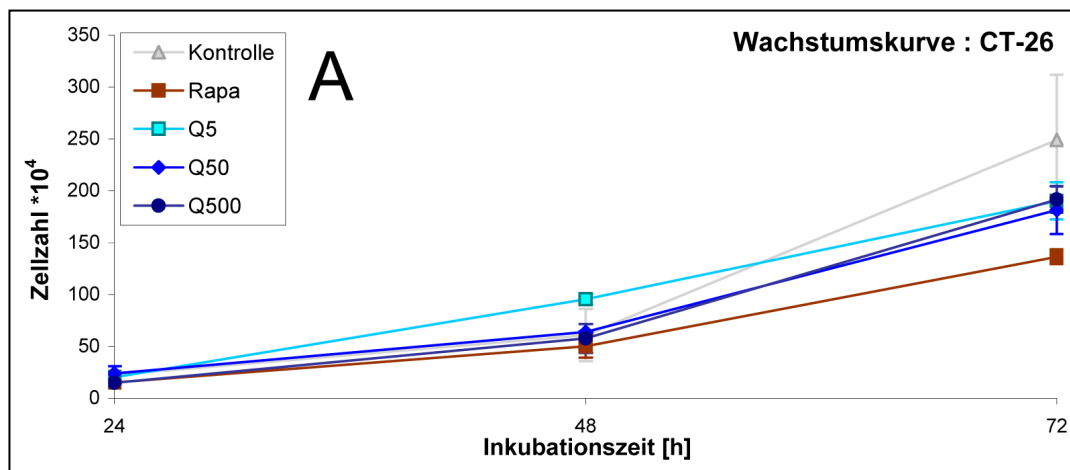
3.3.1.3 CT-26, Experimente 6 + 7

Mit der neuen Aufreinigung wurden zwei weitere Experimente mit CT-26 durchgeführt. Im ersten Experiment 6 konnte in der Wachstumskurve ebenfalls keine signifikante Zellzahlse-
 nkung nachgewiesen werden (siehe

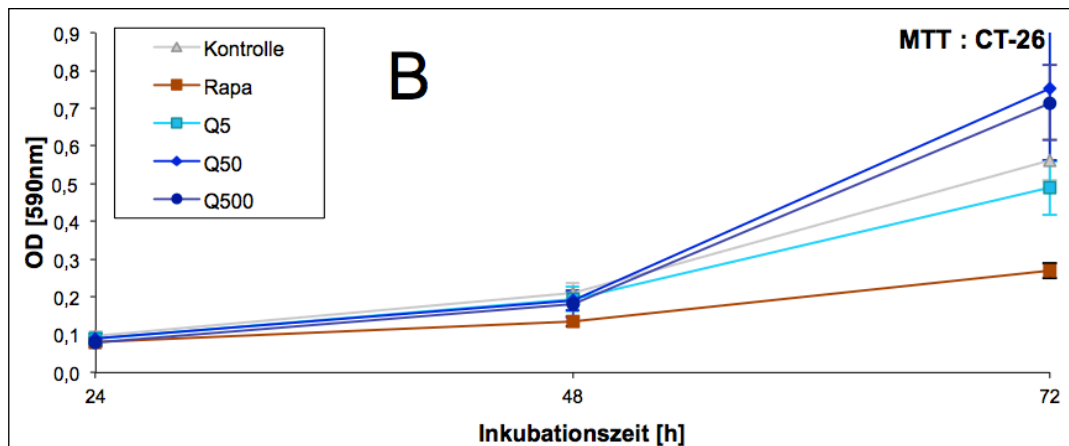
Abbildung 25 A), was aber möglicherweise an den großen Ausreißern des Kontrollwertes liegen könnte. Auch im MTT konnten die im ersten Versuch aufgetretenen aktivitätssenkenden Eigenschaften von Q500 nicht reproduziert werden (siehe

Abbildung 25 B). Die leichte Senkung beim 48h Wert in Q500 ($p=0,036$) gegenüber der Kontrolle war beim 72h Wert nicht mehr messbar. Lediglich die niedrigste Konzentration Q5 zeigte eine leichte, signifikante Senkung beim 72h Wert. Diese Feststellung, dass Elicitin möglicherweise in einer geringeren Dosis wirkt, gab Anlass dazu, Elicitin auch in einer noch niedrigeren Dosis von 0,5ng/ml zu testen. Während die mitochondriale Aktivität pro Einzelzelle der Kontrolle und der Rapamycinprobe im zeitlichen Verlauf sinkt, ist bei den Quercininproben ein Aktivitätsanstieg zwischen 48 und 72 Stunden zu beobachten (siehe

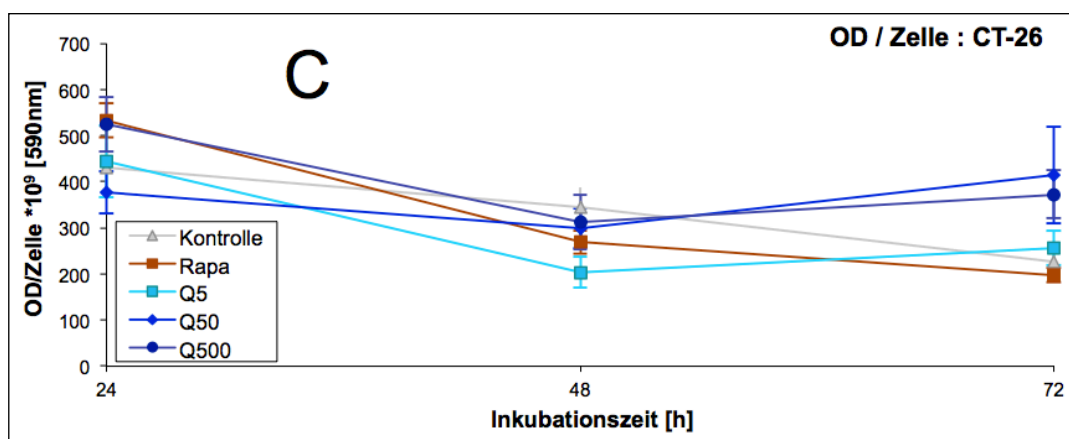
Abbildung 25 C).



T-Test Kontrolle (A)	vs.	Rapa	Q5	Q50	Q500
24h		*			*
48h					
72h					



T-Test vs. Kontrolle (B)	Rapa	Q5	Q50	Q500
24h	*			*
48h	**			*
72h	*	*	*	**



T-Test vs. Kontrolle (C)	Rapa	Q5	Q50	Q500
24h	**		*	*
48h	**	**	*	
72h	*	*	*	*

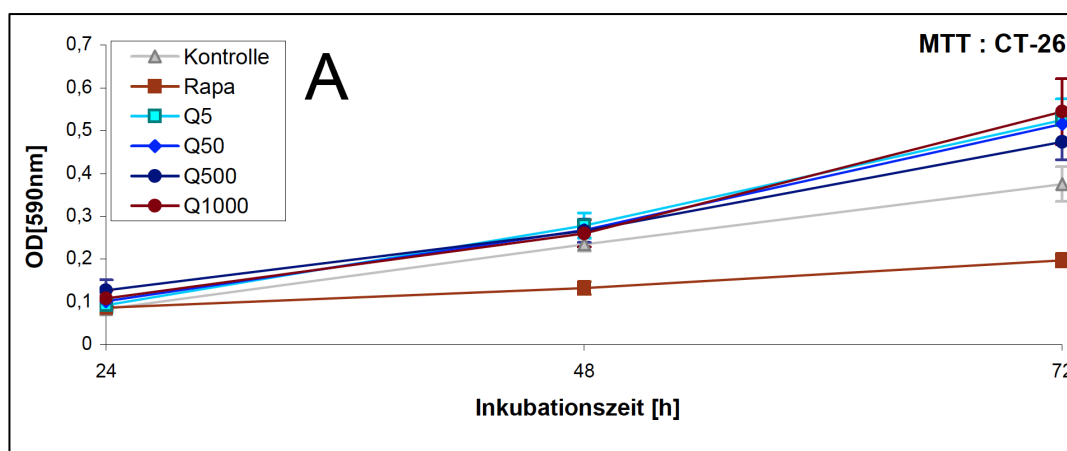
Abbildung 25 Grafische Darstellung von Experiment 6, CT-26 Zellen zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten (t = 24h, 48h, 72h \pm SD). * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$.

A Stellt die absolut gemessenen Zellzahlen der unterschiedlichen Gruppen dar. Es sind keine Signifikanzen erkennbar.

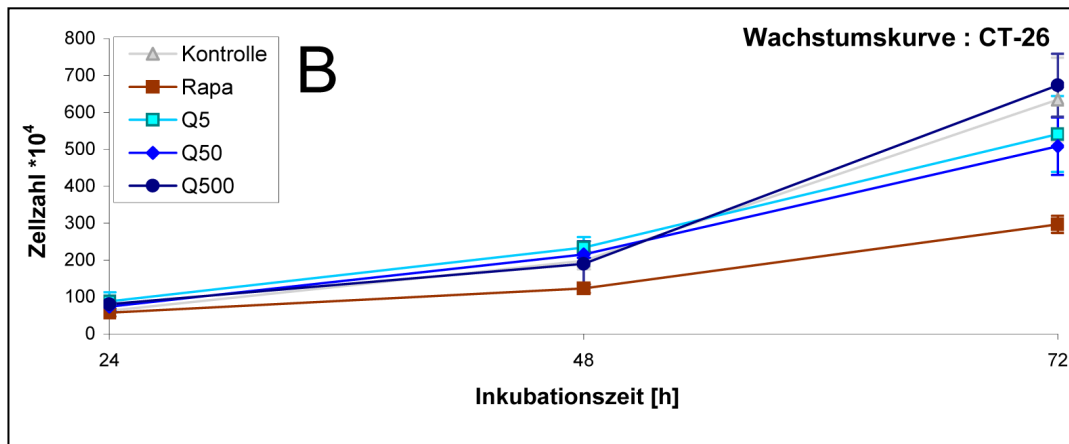
B zeigt die bei 590nm gemessene optische Dichte. Nach 72h zeigte sich eine signifikante Aktivitätssenkung der niedrigsten Elicitin-Konzentration.

C veranschaulicht den zeitlichen Verlauf der bei 590nm gemessenen optischen Dichte / absolute Zellzahl. Dies entspricht der mitochondrialen Aktivität pro Einzelzelle. Nach 72h kommt es bei Quercetin zu einem Anstieg der Aktivität pro Einzelzelle.

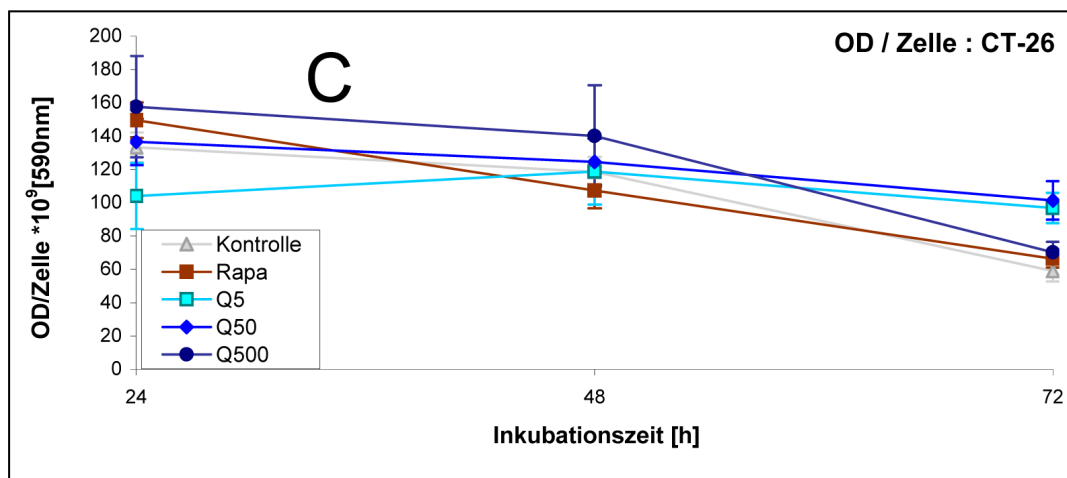
Die Senkung der mitochondrialen Aktivität in der niedrigsten Quercetinkonzentration konnte im darauf folgenden Experiment 7 unter gleichen Bedingungen mit derselben Charge jedoch nicht reproduziert werden (siehe Abbildung 26 A), so zeigten sich hier gegenüber der Kontrolle signifikant erhöhte Werte in allen Q-Konzentration von 5-1000ng/ml. Auch in Bezug auf die Zellzahl konnten in der Wiederholung des Versuchs keine signifikanten Ergebnisse für Elicitin erzielt werden. Lediglich Rapamycin zeigte ab dem 48h Wert signifikant gesenkte Zellzahlen ($p=0,008$ und $0,003$) (siehe Abbildung 26 B). Der MTT-Anstieg bei der 72h Messung in den Konzentrationen Q50 und Q500 sowie ein Anstieg der OD/Zelle in allen Q Konzentrationen war jedoch reproduzierbar und ist beiden Versuchen gemein (siehe Abbildung 26 A und C).



T-Test vs. Kontrolle (A)	Rapa	Q5	Q50	Q500
24h			**	**
48h	**	**	**	*
72h	*	*	*	*



T-Test vs. Kontrolle (B)	Rapa	Q5	Q50	Q500
24h				
48h	*			
72h	*			



T-Test vs. Kontrolle (C)	Rapa	Q5	Q50	Q500
24h		*		*
48h	**			**
72h	*	**	**	**

Abbildung 26 Grafische Darstellung von Experiment 7, CT-26 Zellen zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten ($t = 24h, 48h, 72h \pm SD$). * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$.

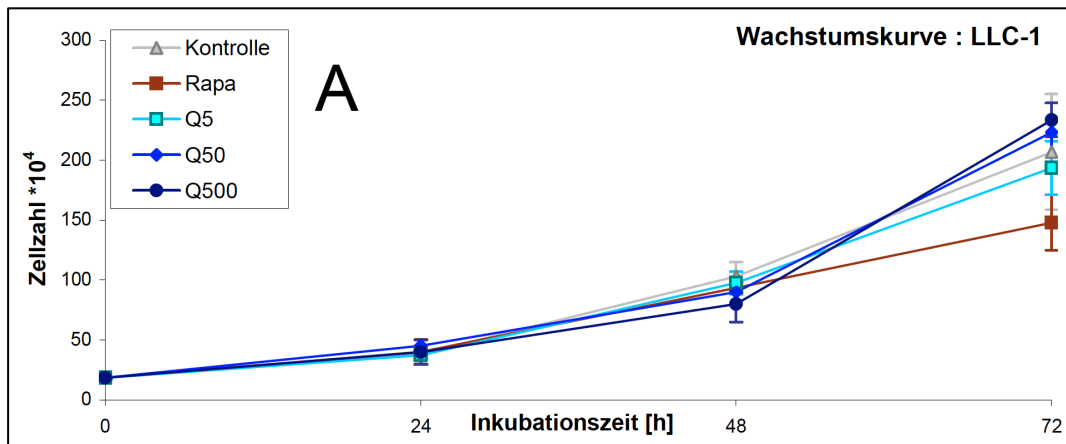
A zeigt die bei 590nm gemessene optische Dichte. Die Senkung der mitochondrialen Aktivität durch Quercinin 5 konnte nicht reproduziert werden (Vergleiche Abbildung 25 B). Alle Quercininwerte sind nach 72h signifikant erhöht.

B Stellt die absolut gemessenen Zellzahlen der unterschiedlichen Gruppen dar. Es zeigen sich keine signifikant veränderten Werte für Quercinin.

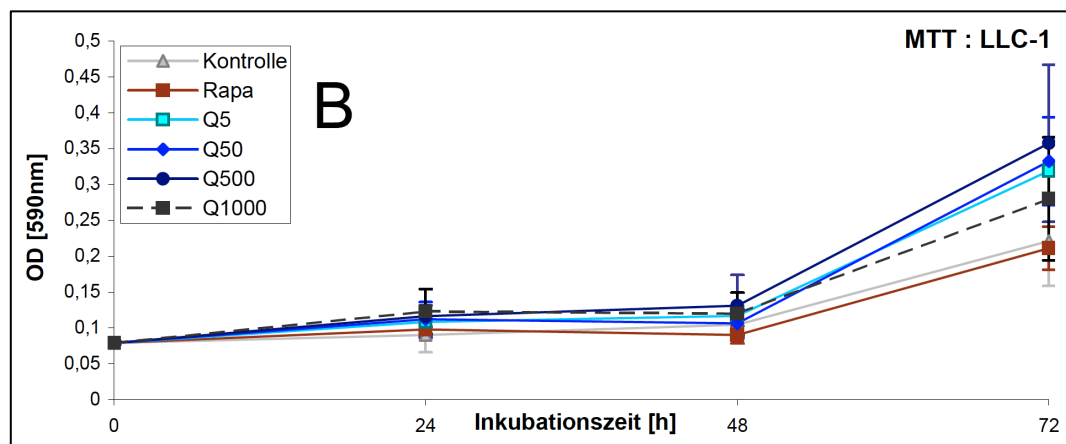
C veranschaulicht den zeitlichen Verlauf der bei 590nm gemessenen optischen Dichte / absolute Zellzahl. Dies entspricht der mitochondrialen Aktivität pro Einzelzelle. Nach 72h sind alle Quercininwerte hochsignifikant erhöht wie im Vorversuch (Vergleich **Abbildung 25 C**)

3.3.1.4 LLC-1, Experiment 8

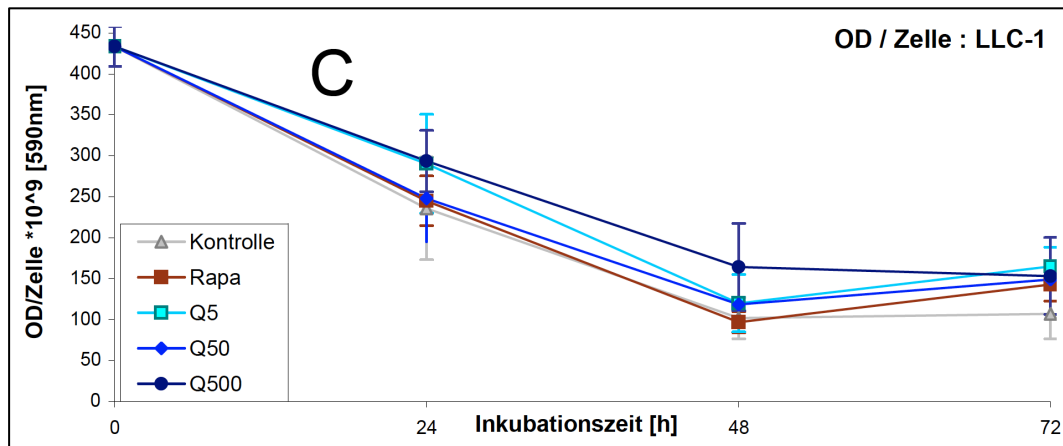
Im Zuge der Testung an verschiedenen Zelllinien erfolgte das nächste Experiment 8 mit LLC-1-Zellen. Bezüglich der Zellzahl waren in der Wachstumskurve abermals keine Senkungen zu sehen (siehe Abbildung 27 A). Ferner war eine tendenzielle Zellzahlsenkung in den höchsten Quercininkonzentrationen beim 72h Wert genau gegenläufig zu beobachten, das heißt mit dem größten Effekt der 5ng/ml Konzentration. Da jedoch keiner der Werte signifikant ist, sind diese Schwankungen am wahrscheinlichsten durch Messunschärfe bedingt. Im MTT waren beim 24h Wert teils signifikante Aktivitätssteigerungen messbar (siehe Abbildung 27 B) und auch beim 72h Wert zeigten sich in allen Quercininkonzentrationen von 5-1000ng/ml signifikante und hochsignifikante Aktivitätserhöhungen. Diese Gesamtaktivitätserhöhungen spiegelten sich auch in einer erhöhten durchschnittlichen Aktivität pro Einzelzelle wider (siehe Abbildung 27 C). Q500 war dabei zu allen Zeitpunkten signifikant erhöht. Nach 72 Stunden bewirkten dann auch die niedrigeren Quercininkonzentrationen eine Aktivitätssteigerung pro Einzelzelle. Rapamycin zeigte unterdessen anfangs keinen Effekt und ließ erst nach 48h einen signifikanten Aktivitätsanstieg pro Zelle erkennen.



T-Test vs. Kontrolle (A)	Rapa	Q5	Q50	Q500
24h			*	
48h				
72h				



T-Test vs. Kontrolle (B)	Rapa	Q5	Q50	Q500	Q1000
24h		*	*	**	
48h					
72h		**	**	**	*



T-Test vs. Kontrolle (C)	Rapa	Q5	Q50	Q500
24h		*		*
48h				** tf
72h	*	**	*	*

Abbildung 27 Grafische Darstellung von Experiment 8, LLC-1 Zellen zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten (t = 24h, 48h, 72h \pm SD).

A Stellt die absolut gemessenen Zellzahlen der unterschiedlichen Gruppen dar. Es kommt zu keinen signifikanten quercininbedingten Zellzahlsenkungen.

B zeigt die bei 590nm gemessene optische Dichte, Verwendung von Q5 bis Q1000. Nach 72h zeigt sich eine erhöhte Aktivität bei allen Quercininkonzentrationen.

C veranschaulicht den zeitlichen Verlauf der bei 590nm gemessenen optischen Dichte / absolute Zellzahl. Dies entspricht der mitochondrialen Aktivität pro Einzelzelle.

* kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$.

3.3.1.5 Rückkehr zu B-16

3.3.1.5.1 Zellkultur, Experiment 9

Wie in den ersten Experimenten zu sehen ist, hat Quercinin möglicherweise Potential als mögliches Krebstherapeutikum. Da bei den in den vorherigen Experimenten verwendeten Zelllinien nicht die gewünschten, reproduzierbaren, starken Effekte auftraten, wurden wiederholt Experimente mit B-16 Zelllinien durchgeführt, die bei den anfänglichen Screeningversuchen am sensitivsten auf Elicitinbehandlung reagiert hatten. Weil bei Pflanzen sowohl

makroskopische als auch mikroskopische Veränderungen unter Elicitineinfluss beschrieben sind, wurden neben einer abermaligen Zellzahlbestimmung zusätzlich Experimente auf molekularer Ebene an B-16 durchgeführt.

Bei der Wiederholung der B-16 Experimente in Experiment 9 mit der neuen Elicitincharge AF3 1.2 zeigten sich dieses Mal außer bei Rapamycin keine gegenüber der Kontrolle signifikant gesenkten Werte in Wachstumskurve (Abbildung 28 A) und MTT (Abbildung 28 B). Im MTT auffällig ist der Anstieg der Aktivitätswerte aller Elicitingruppen, sowie der Kontrolle im Zeitfenster von 48h bis 72h, der sich möglicherweise jedoch dadurch begründen lässt, dass die dünn ausgesäten B-16-Zellen bei Zell-Zell-Kontakt (zeitlich kurz vor Konfluenz des Wells) wieder stoffwechselaktiver werden. Im MTT/Einzelle zeigte Quercinin zu allen Zeitpunkten einen teilweise signifikanten Anstieg der mitochondrialen Aktivität pro Einzelle gegenüber der Kontrolle, während Rapamycin nach 48h und 72h wieder seine hemmende Wirkung auf die Aktivität pro Einzelle entfaltete (Abbildung 28 C).

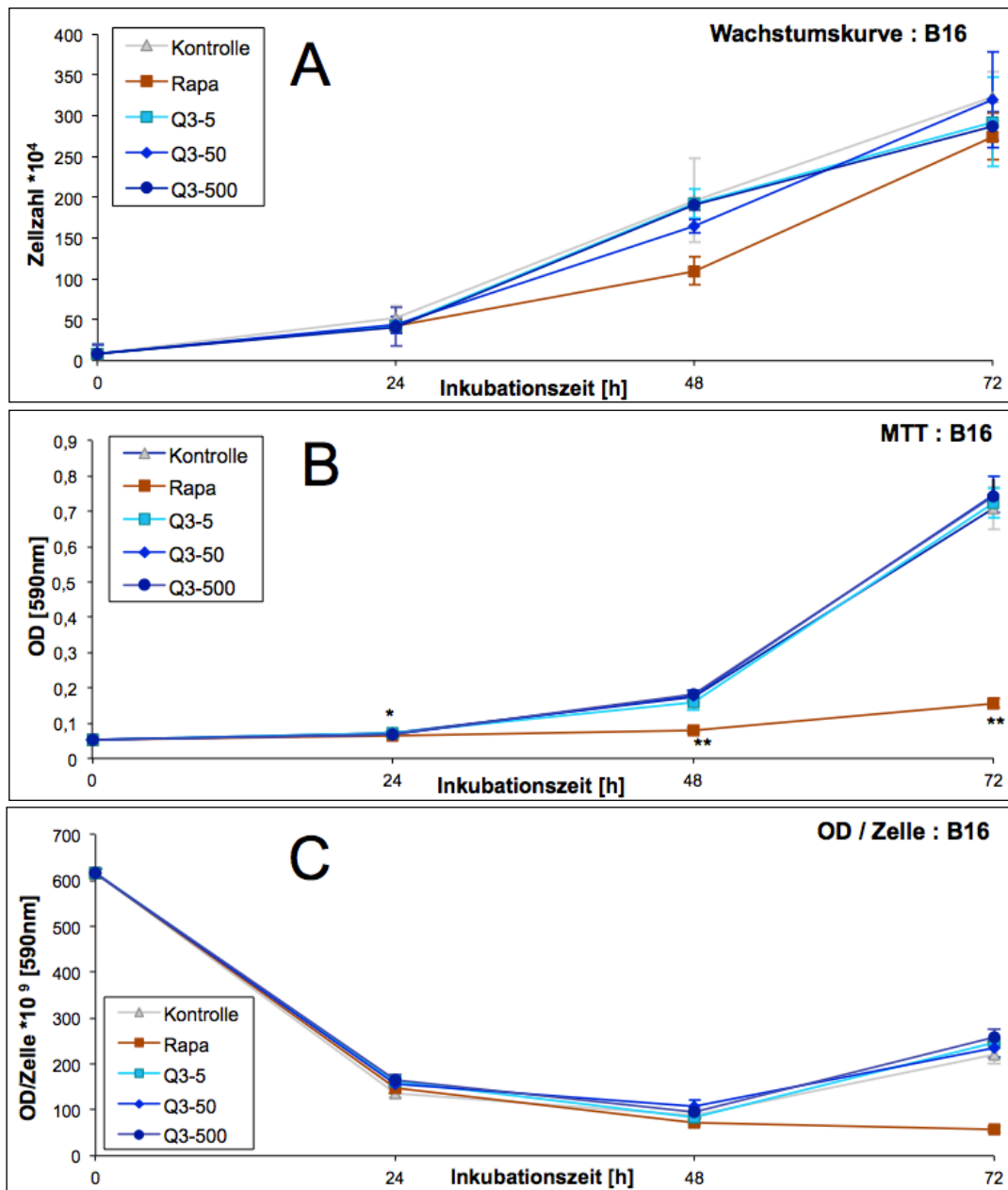


Abbildung 28 Grafische Darstellung von Experiment 9, B-16 Zellen zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten (t = 24h, 48h, 72h \pm SD).

A Stellt die absolut gemessenen Zellzahlen der unterschiedlichen Gruppen dar. Es traten keine signifikanten Werte auf.

B zeigt die bei 590nm gemessene optische Dichte. Außer der Rapamycin-Kontrolle traten keine Signifikanzen auf.

C veranschaulicht den zeitlichen Verlauf der bei 590nm gemessenen optischen Dichte / absolute Zellzahl. Dies entspricht der mitochondrialen Aktivität pro Einzelzelle. Statistische Signifikanzen in Tabelle unter Diagramm.

* kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$.

T-Test vs. Kontrolle (C)	Rapa	Q5	Q50	Q500
24h	*	*	*	*
48h	**		**	
72h	**	*		**

3.3.1.5.2 Kreuztestung der BCA Reagenzien

Um systematische Unterschiede zwischen den beiden Proteinbestimmungen (Laboratorien von Prof. Dr. Oßwald und Prof. Dr. Geissler) auszuschließen und die Vergleichbarkeit mit den bei Pflanzen angewendeten Quercininkonzentrationen zu gewährleisten, wurden komparative Proteinbestimmungen einer Elicitin-Verdünnungsreihe sowie eine Kreuztestung der BCA-Reagenzien beider Laboratorien durchgeführt (siehe Abbildung 29). Bei der Kreuztestung der Reagenzien wichen unsere Messungen um durchschnittlich 11 % von den in Prof. Dr. Oßwald's Labor gemessenen Werten ab. Die fehlende Wirkung des Quercinins dieser Charge ist jedoch ursächlich nicht auf einen technischen Fehler bei der Proteinbestimmung zurückführbar, weil in unseren Labors auch das Quercinin der ersten Charge niedriger bestimmt wurde, aber dennoch ein starker zelltötender Effekt eintrat.

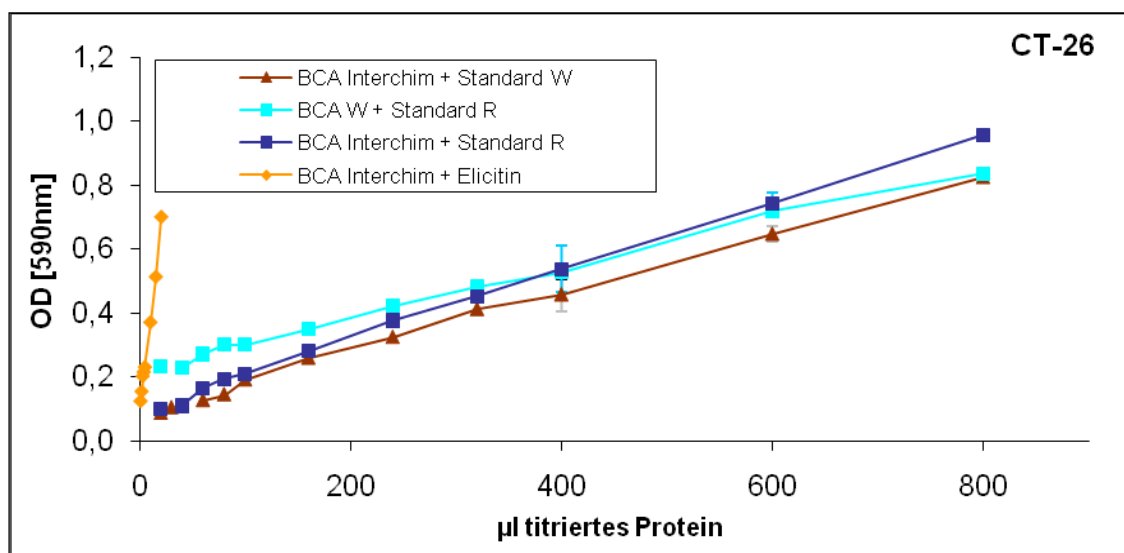


Abbildung 29 Grafische Darstellung des Vergleichs der BCA-Reagenzien der Laboratorien von Prof. Dr. Geissler und Prof. Dr. Oßwald. W steht für die in Prof. Dr. Oßwalds Labor verwendeten Reagenzien, R steht für die

in Prof. Dr. Geisslers Labor verwendeten Reagenzien. Ein systematischer Fehler bei der Proteinquantifizierung konnte durch Kreuztestung der verwendeten Reagenzien ausgeschlossen werden.

3.3.1.5.3 H_2O_2 -Messung, Experiment 10

Die Mechanismen der H_2O_2 -Produktion wurden bereits in der Einleitung dargestellt. In den Elicitinversuchen mit Tabak war je nach Kultivar und Quercinin-Konzentration zwischen 1 und 4 Stunden nach Elicitinexposition ein starker, signifikanter H_2O_2 -Anstieg zu beobachten [24] und so wurden auch bei den Säugerzellxperimenten in diesem Zeitraum und darüber hinaus Proben entnommen und auf deren H_2O_2 Gehalt untersucht. Mit dem gleichen Kit, welches in Prof. Dr. Oßwald's Labor zur Messung des extrazellulären H_2O_2 's benutzt wurde, erfolgte eine extrazelluläre Messung nach Elicitinexposition an B-16 Zellen. Hierbei zeigte sich zu keinem der gemessenen Zeitpunkte nach 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 24, 48 oder 72h eine signifikante Abweichung von der Kontrolle (siehe

Abbildung 30). Zur Messung wurde aus einer mit 20ml Medium gefüllten Flasche pro Messung jeweils 500 μ l des Überstandes entnommen. Das durch die Überstandsentnahme verringerte Mediumvolumen pro vitale Zelle bei den letzten Messungen (Anfangs 20ml Medium pro Gesamtzellzahl, bei letzter Messung nur 15ml Medium pro Gesamtzellzahl) hätte eher zu einer Akkumulation des H_2O_2 geführt - da trotz dieser Tatsache keine erhöhten H_2O_2 Werte messbar waren, ist eine elicitininduzierte, extrazelluläre H_2O_2 Produktion unwahrscheinlich.

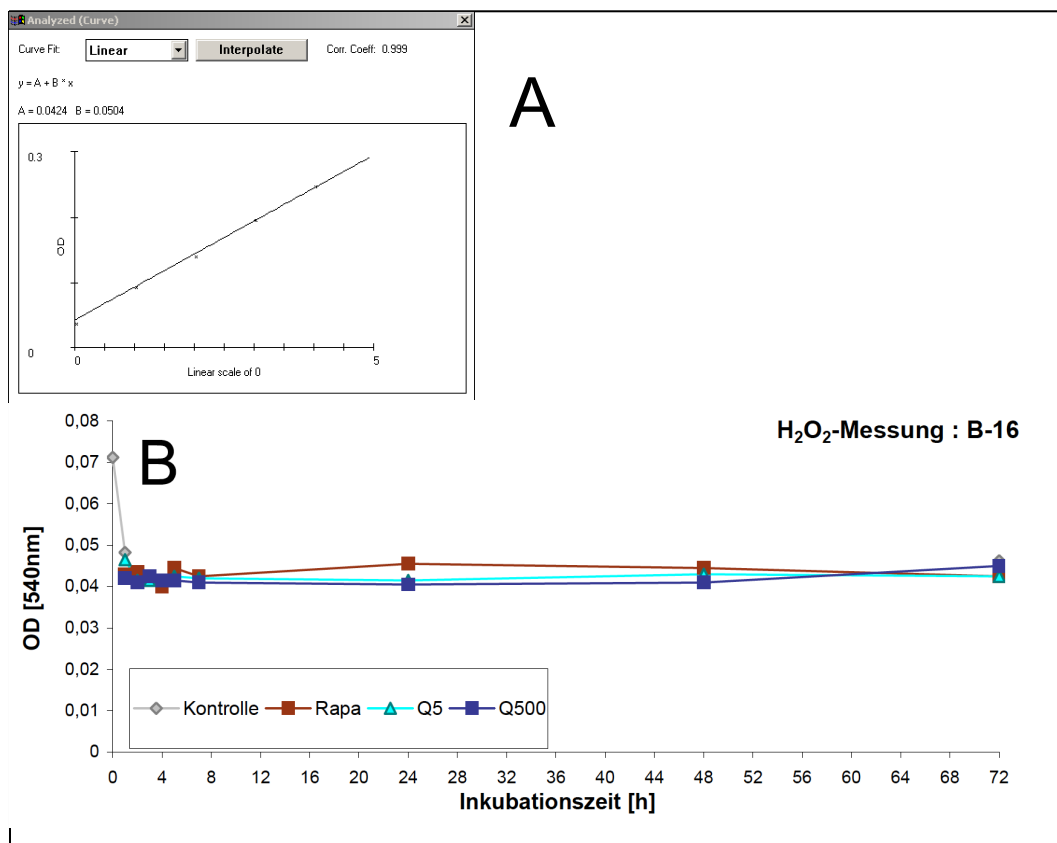


Abbildung 30

A Grafische Darstellung der gemessenen H_2O_2 -Standardkurve ($c = 1, 2, 3, 4, 5 \text{ nmol/well}$)

B zeigt die bei 540nm gemessene optische Dichte zu unterschiedlichen Messzeitpunkten ($t = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 24, 48$ und 72 h). Extrazellulär sind keine erhöhten H_2O_2 Werte zu messen. Eine elicitininduzierte Produktion von H_2O_2 ist deshalb unwahrscheinlich.

3.3.1.5.4 Westernblots, Experiment 11

In Experiment 11 wurden mit Hilfe von Westernblots die in der Einleitung beschriebenen Signaltransduktionswege untersucht. Mit den verwendeten Labormethoden unserer Westernblots sind Phosphorylierungen prinzipiell dabei sehr gut nachweisbar, wie am Beispiel der durch Rapamycin supprimierten p70S6-Kinase ersichtlich ist. Als Apoptosescreeing wurde ein Blot mit Antikörpern gegen Caspase-3 in einem B-16-Zelllysats angefertigt, in dem sich allerdings keine Aktivierung nachweisen ließ. Normalerweise wäre hier von einer Caspase-aktivierung auszugehen gewesen.

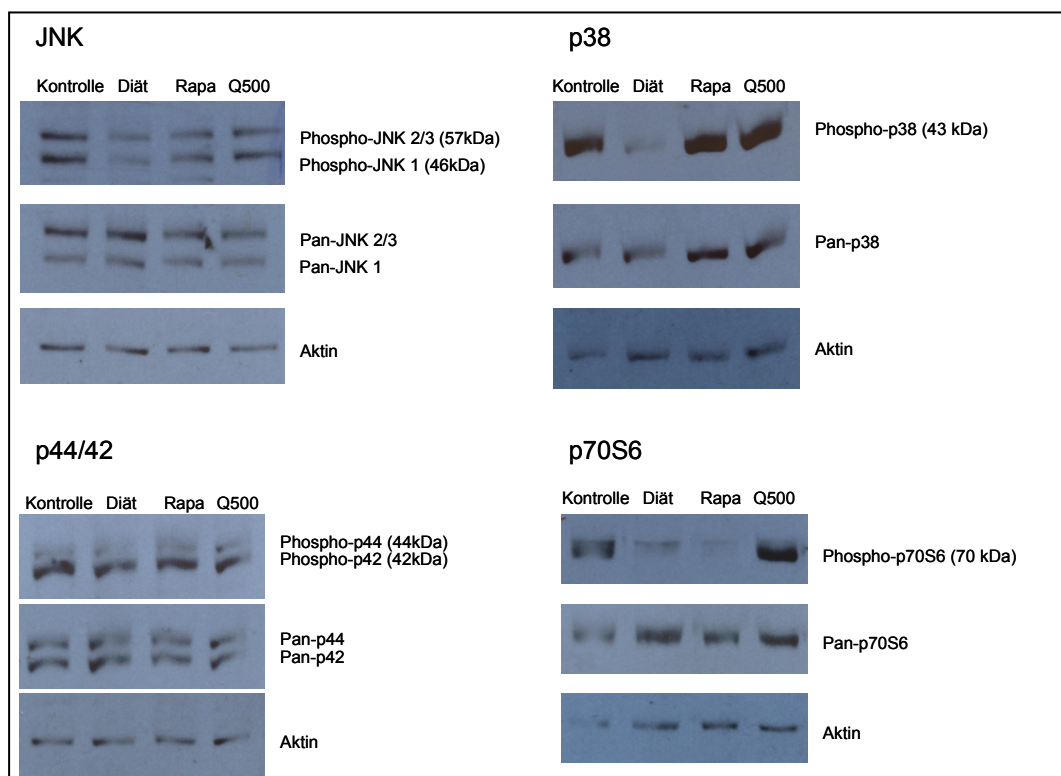


Abbildung 31 Exemplarische Darstellung der Westernblots mit Antikörpern gegen JNK, p38, P44/42 und p70S6. Während bei den Westernblots von p38 und JNK keine Änderung auftrat, ist bei den Kinasen p 44/42 und p70S6 möglicherweise von einer Regulation nach unten auszugehen.

p70S6: Die p70S6-Kinase ist ein Schlüsselprotein des AKT/mTOR-Pathways. Im Falle einer Proliferationsminderung, die durch eine Inhibition des AKT/mTOR-Signaltransduktionsweges bedingt ist, wäre eine Regulation nach unten zu erwarten. Im ersten Experiment konnte unter Querciningabe eine leichte Regulation nach unten gezeigt werden, die jedoch deutlich schwächer als Rapamycin ausfiel. Der Effekt konnte im zweiten Experiment nicht bestätigt werden.

JNK: Als „Stresskinase“ wirkt JNK u.a. über eine Inaktivierung des anti-apoptotisch wirksamen Bcl-2 sowie über eine Aktivierung des pro-apoptotischen Bax. In keinem der beiden durchgeführten Westernblots konnte eine Regulation festgestellt werden.

p38: p38 induziert in aktiviertem Zustand ebenfalls pro-apoptotische Effekte und kann u.a. durch Stressstimuli, UV-Bestrahlung, Lipopolysaccharide, Hitzeschock, osmotischen Schock und Zytokine aktiviert werden. Desweiteren ist p38 an essentiellen zellulären Vorgängen wie Entzündung, Zelldifferenzierung, Zellreifung, Zellalterungsprozesse, Zellzyklusregulation und Tumorigenese beteiligt [95]. Falls Quercinin über p38 wirken sollte, wäre eine Regulation nach unten zu erwarten gewesen, was jedoch in keinem der beiden hergestellten Westernblots gezeigt werden konnte.

p44/42: Die p44/42 Kinase, welche auch als ERK1/2 bekannt ist, ist an allen großen essentiellen Zellphysiologiebereichen wie z.B. auch an Zelldifferenzierung und Proliferation beteiligt [96]. Über die aktivierte ERK, welche in den Ras-Raf-Pathway eingebunden ist, kann Apoptose sowohl intrinsisch (durch Induktion von mitochondrialem Cytochrom c) als auch extrinsisch vermittelt werden (durch Caspase8-Aktivierung, permanenten Zellzyklusarrest oder autophagische Vakuolisierung) [97]. In diesem Fall wäre von einer Aktivierung von p44/42, d.h. einer Regulation nach oben auszugehen gewesen, was in keinem der zwei durchgeführten Westernblots feststellbar war. Es ist jedoch möglich, dass p44/42 leicht nach unten reguliert sind.

Um sich zu vergewissern, dass das Elicitin der Fraktion AF3.2 (entspricht 2.1.2.1.) durch die Lagerung nicht an Aktivität eingebüßt hat, wurde ein Aliquot erneut auf seine biologische Aktivität in *Nicotiana tabacum* getestet und es gelang im Labor von Prof. Dr. Osswald erneut eine Hypersensitive Reaktion zu induzieren (persönliche Kommunikation mit Dr. Bleischwitz).

3.3.1.5.5 Diätexperimente

Die in Experiment 15 festgestellte Beobachtung, dass Quercinin in den Proben OHNE Mediumwechsel besser wirkte, führte zu den nächsten Experimenten 12a und 12b mit folgender Überlegung: Vielleicht wurden die Zellen durch den Mangel an O₂, Nährstoffen und aufgrund des fehlenden Metabolitenabtransports im Tumorzentrum einerseits oder wegen des Mediumverbrauchs andererseits gestresst und machten sie so sensativer für die Quercininwirkungen. Die Nährstoffmangelsituation wurde experimentell nun dadurch simuliert, dass die Zellen zeitweise in FCS-freiem Diät-Medium inkubiert wurden.

3.3.1.5.5.1 Diätstress vor Elicitingabe, Experiment 12a

In diesem Experiment wurde nach einer 12-stündigen Diät in FCS-freiem Medium die Verdünnungsreihe in FCS-haltigem Medium appliziert. Während Rapamycin sowohl nach 48h, als auch nach 72h einen signifikanten Effekt gegenüber der Kontrolle zeigte, traten bei Q3 sowohl in der Konzentration 50ng/ml als auch in der Konzentration 500ng/ml zu keinem Zeitpunkt signifikante Ergebnisse auf (siehe Abbildung 32).

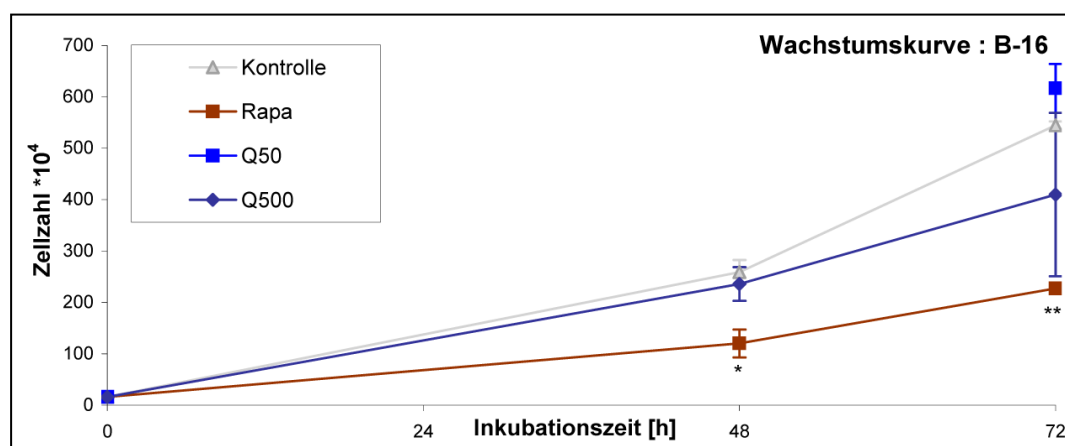


Abbildung 32 Grafische Darstellung von Experiment 12a an B-16 Zellen. Nach 12-stündiger Inkubation in FCS-freiem Medium wurde die Verdünnungsreihe in Medium mit 10% FCS gegeben und in Tripeln zu den Versuchszeitpunkten t=48h und 72h ausgezählt. Die 12-stündige Vorbehandlung der Zellen in Diät-Medium führte zu keiner verstärkten Wirkung von Quercinin.

Dargestellt sind die absolut gemessenen Zellzahlen der unterschiedlichen Gruppen

* kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$.

3.3.1.5.5.2 Diätstress bei gleichzeitiger Elicitingabe, Experiment 12b

Im zweiten Teil des Versuches wurde nach der 12h Diät noch ein Mediumwechsel durchgeführt, bei dem die Wirkstoffe nun allerdings erneut in FCS-freiem Medium zu den Zellen gegeben wurden. Dadurch sollte untersucht werden, wie Quercetin unter gleichzeitiger Diät und damit verstärktem Stress wirkt. 14h später wurden die Flaschen ausgezählt, jedoch war kein signifikanter Zellzahlunterschied gegenüber der Diät-Kontrolle (nach 12-stündiger Diät in FCS-freiem Medium, erfolgte ein Medium mit erneutem FCS-freiem Medium) zu erkennen (siehe Abbildung 33).

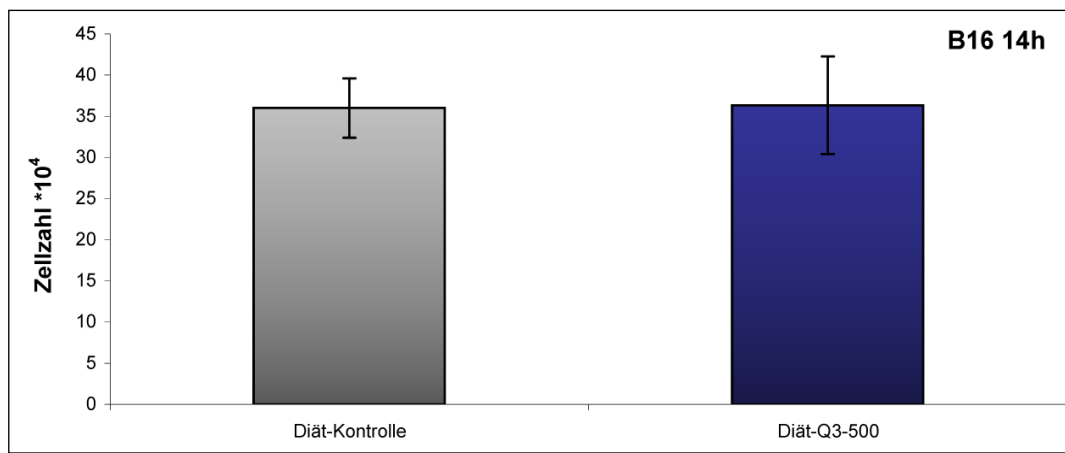


Abbildung 33 Grafische Darstellung von Experiment 12b an B-16 Zellen. Nach 12-stündiger Inkubation in FCS-freiem Medium wurde die Verdünnungsreihe abermals in FCS-freiem Medium gegeben. Nach 14 Stunden Inkubation wurde in Tripeln ausgezählt.

Dargestellt sind die absolut gemessenen Zellzahlen der unterschiedlichen Gruppen. Es traten keine Signifikanzen auf.

3.3.1.5.5.3 Diätexperiment mit aufsteigenden FCS Konzentrationen im Medium, Experiment 13 (entspricht EI 19)

Mit Experiment 13 folgte ein weiteres B-16-Diätexperiment mit Q3-500 und Rapamycin als Referenz. Es gab drei Reihen jeweils mit 0%, 1% und 10% FCS pro gezähltem Zeitpunkt.

0%FCS (Abbildung 34 A):

Im 0% FCS-Ansatz waren nach 24h noch keine signifikanten Ergebnisse zu sehen, wohingegen beim 48h Wert jedoch bei Q3-500 eine signifikante Zellzahlsenkung im Vergleich zur Kontrolle feststellbar (-22% $p=0,03$) war. Elicitin scheint also bei zuvor sehr stark gestressten Zellen Zelltod induzieren zu können. Ein 72h Wert existiert nicht, weil die Zellen erwar-

tungsgemäß bereits vor dem Auszählen durch den Nährstoffmangel bedingt untergegangen waren.

1%FCS (Abbildung 34 B):

Im 1% FCS-Ansatz zeigte Q3-500 nach 24h und 48h eine leichte wachstumshemmende Tendenz, die jedoch beim 72-h Wert nicht mehr festzustellen war. Rapamycin zeigte zu allen Zeitpunkten seine zellzahlensenkende Wirkung, die stets signifikant ausfiel ($p=0,02$; $0,038$; $<0,001$)

10%FCS (Abbildung 34 C): (=normale Bedingungen):

Im 10% FCS-Ansatz zeigte sich zwar nach 24h eine Q3-bedingte Zellzahlensenkung, jedoch konnte diese zu späteren Zeitpunkten nicht mehr nachgewiesen werden. Rapamycin wirkte ab dem 48h Wert signifikant ($p=0,018$).

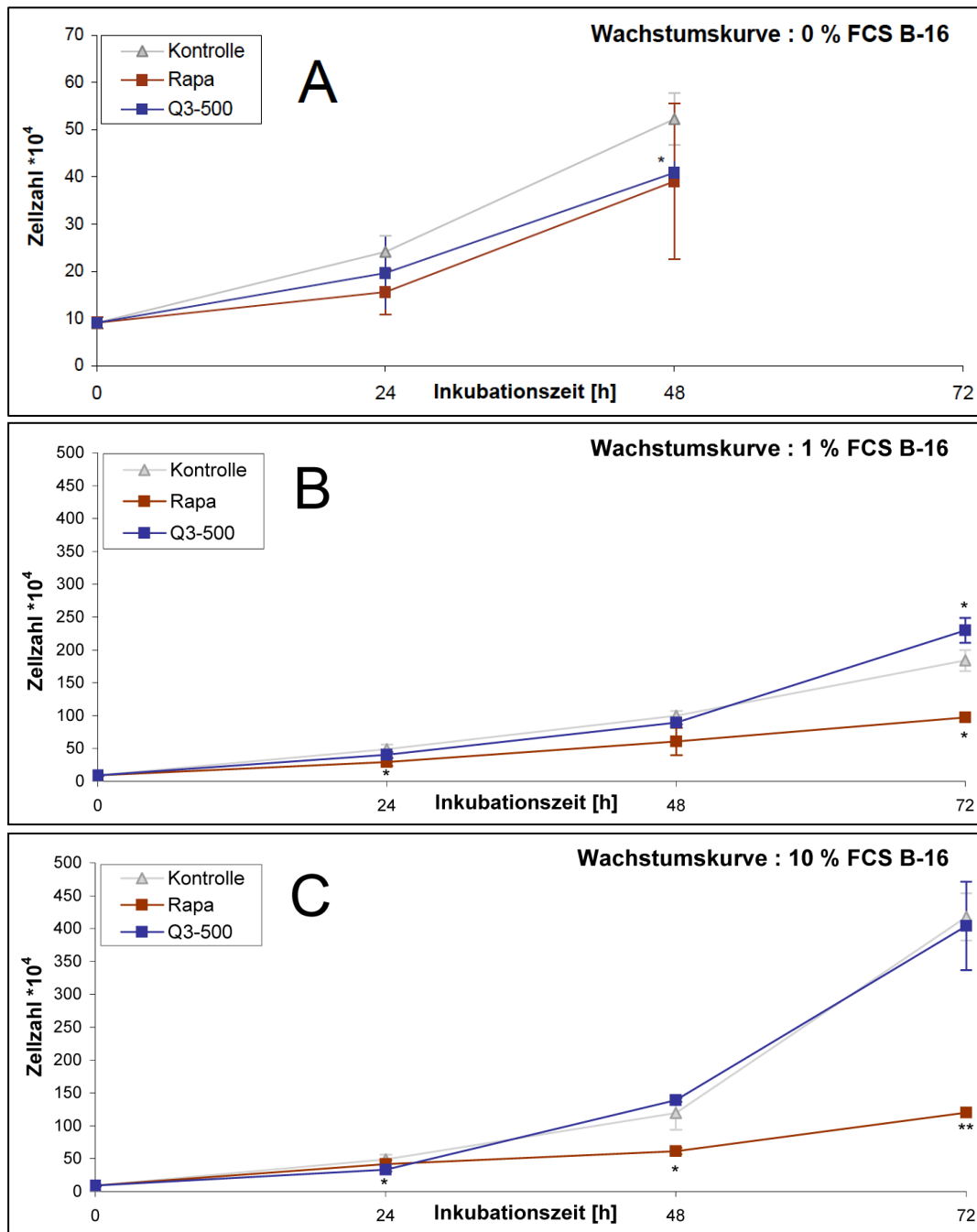


Abbildung 34 Grafische Darstellung von Experiment 13 zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten ($t = 24\text{h}$, 48h , $72\text{h} \pm \text{SD}$) an B-16. Dargestellt sind die absolut gemessenen Zellzahlen der unterschiedlichen Gruppen. Verwendet wurde Q3 mit jeweils unterschiedlichem Gehalt an FCS (0% in A ; 1% in B und 10 % in C). * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$.

3.3.1.5.6 FACS-Analyse, Experiment 14 (entspricht El 20)

Um den Einfluss von Q3 auf die Zellproliferation und Apoptose durchflusszytometrisch zu untersuchen, wurden B-16-Zellen im Rahmen der Methodiketablierung mit CFSE in den

unterschiedlichen Konzentrationen 0,5 μM , 1 μM und 2 μM gefärbt und auf ihren Farbstoffgehalt untersucht. Die mit 2 μM CFSE-gefärbten Zellen hatten mit einem Peak bei 10^3 eine sehr gute Fluoreszenz mit guter Differenzierungsmöglichkeit gegenüber den ungefärbten Zellen (siehe Abbildung 35). Die erwartete Fluoreszenzabnahme (Halbierung der Fluoreszenz bei jeder Zellteilung) sollte daher auch noch darstellbar sein für die erwartete Anzahl von 4-6 Teilungen in 72h. Die gefärbten Zellen wurden zur Synchronisation für den Elicitinversuch eine Stunde auf Eis inkubiert und danach plattiert. Nach Inkubationsdauer über Nacht wurde ein Mediumwechsel mit Q3 in den Konzentrationen 5, 50, 500ng/ml durchgeführt. Nach dreitägiger Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen wie gewohnt geerntet, mit dem Apoptosemarker 7AAD markiert und im FACS durchflusszytometrisch analysiert. 7AAD hat in diesem Fall eine doppelte Funktion: Zum einen dient es dem Ausschluss nicht-vitaler Zellen in der CFSE-Untersuchung und zum anderen liefert es zusätzlich eine unabhängige Aussage über die Anzahl apoptotischer Zellen.

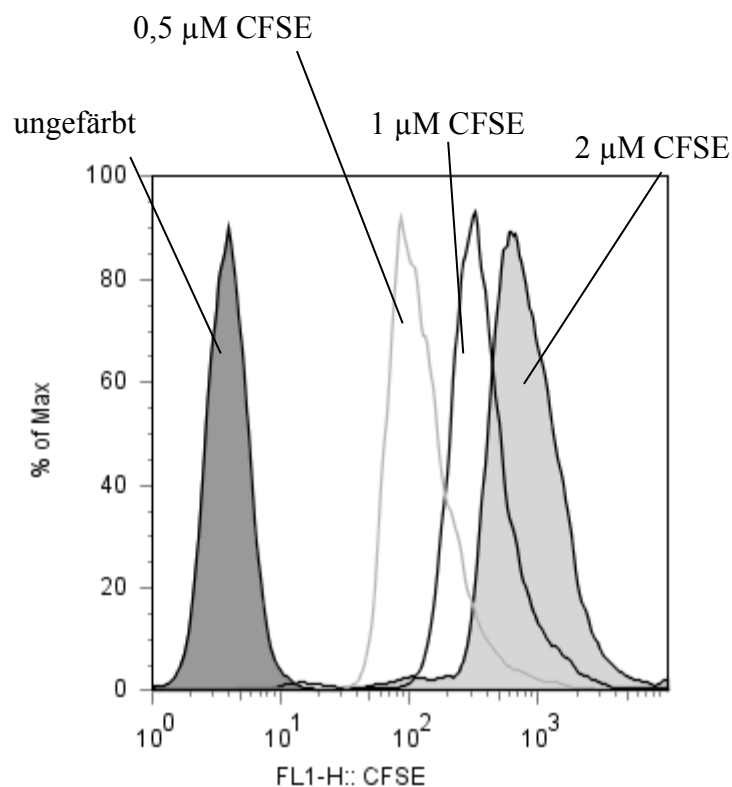


Abbildung 35 Grafische Darstellung der mit unterschiedlichen CFSE-Konzentrationen gefärbten B-16-Zellen vor dem Plattieren. Die mit 2 μM CFSE-gefärbten Zellen haben mit einem Peak bei 10^3 eine sehr gute Fluoreszenz mit guter Differenzierungsmöglichkeit gegenüber den ungefärbten Zellen

3.3.1.5.6.1 CFSE, Experiment 14a

Obwohl die CFSE-Färbung mit 2 μ M CFSE-Lösung am ersten Tag mit 10³ ausreichend hoch war, war der Farbstoffgehalt am dritten Tag sowohl in der Kontrolle, als auch bei den quercinin- und den rapamycinbehandelten Zellen in Richtung der ungefärbten Zellen verschoben. Für Tumorzellen, die sich schnell teilen, wäre ein solcher Verlauf durchaus zu erwarten gewesen. Der erwartete Effekt, dass der CFSE-Peak von Rapamycin als zellteilungshemmende Substanz weiter nach rechts verschoben ist, konnte im Experiment nicht gezeigt werden (siehe Abbildung 36).

3.3.1.5.6.2 7AAD, Experiment 14b

Die Markierung mit 7AAD und dessen Auswertung im FACS ergab, dass Rapamycin hier in geringem Umfang Apoptose induziert. 8% der Zellen waren in der Rapamycin-Probe apoptotisch, während die apoptotischen Zellen der Kontrolle 3% aller Zellen ausmachte. Der Anteil apoptotischer Zellen der Q3-Proben lag mit 2% in jeder Q-Konzentration nahe an der Kontrollprobe (siehe Abbildung 36).

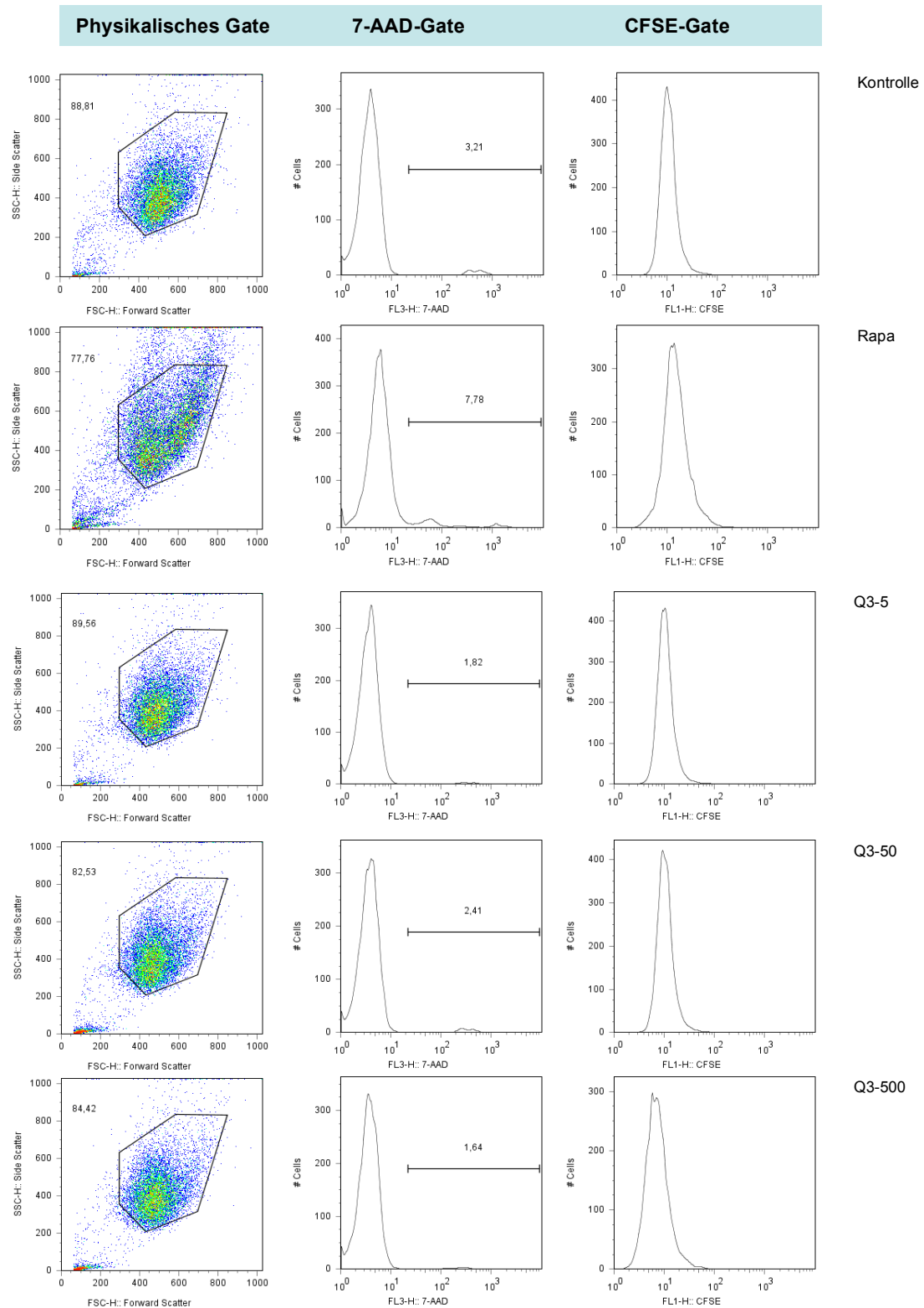


Abbildung 36 Grafische Darstellung von Experiment 14 (FACS-Analyse). Dargestellt sind die Anteile der apoptotischen Zellen in der erfassten Gesamtzellpopulationen für Rapamycin und Quercininkonzentrationen an B-16-Zellen mit Hilfe des physikalischen Gates, sowie der CFSE- und 7AAD-Gates. Möglicherweise hat Rapamycin einen pro-apoptotischen Effekt. Die Apoptoserate der Quercinin-Proben entsprach in etwa der Kontrollprobe.

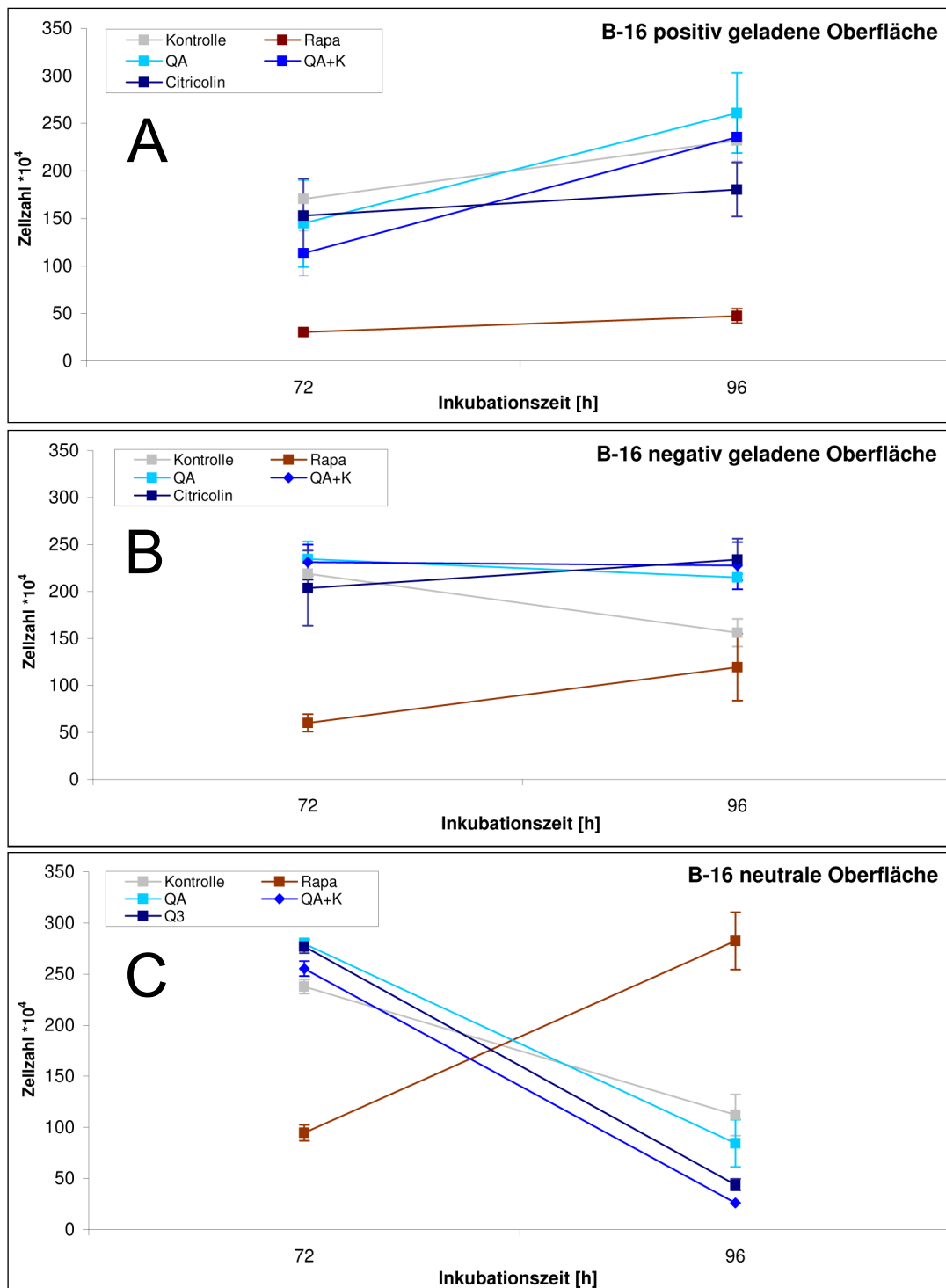
Eine weitere Überlegung war, dass der pH-Wert, welcher bei der Elicitingewinnung vorherrschte, einen Einfluss auf die Quercininaktivität haben könnte. Das in den Screening-experimenten wirksame QI war bei einem pH-Wert von 8 aufgereinigt worden, während bei den nachfolgenden Chargen ein Aufreinigungs pH von 3,5 vorherrschte. Es ist denkbar, dass das Elicitinprotein in Abhängigkeit des pH-Wertes unterschiedlich gefaltet wird und damit eine andere Aktivität aufweist.

3.3.2 VERSUCHE MIT HAUPTSÄCHLICH BASISCHEN ELICITINEN AUS EINEM PHYTOPHTORA QUERCINA KULTURFILTRAT UNTER VERWENDUNG VERSCHIEDENER AUFREINIGUNGSARTEN UND KULTURBEDINGUNGEN

3.3.2.1 Versuche mit unterschiedlichem Aufreinigungsgrad (A bzw. A + K) und Oberflächen, Experiment 15

Im folgenden Experiment wurden unterschiedliche Aufreinigungen von Elicitin, verwendet welche einmal ausschließlich über einen Anionenaustauscher und das andere mal über einen Anionentauscher sowie einen zusätzlich nachgeschalteten Kationenaustauscher aufgereinigt wurden. Die Elicitine wurden anschließend auf unterschiedlichen Oberflächen getestet, um eine Bindung von Elicitin durch die Plastikoberfläche auszuschließen. Verwendet wurden dabei positiv geladene Aminooberflächen, negativ geladene Carboxyoberflächen, sowie neutral geladene Oberflächen von T-25 Flaschen und 6-Well-Platten. Es wurden Rapamycin-konzentrationen von 10ng/ml und Elicitinkonzentrationen von 500ng/ml eingesetzt. Es zeigte sich, dass die Zellen auf einer neutralen Oberfläche (Abbildung 37 C) am besten wachsen und Zellen aller Wells mit Ausnahme von Rapamycin nach Erreichen der Konfluenz abschwimmen. Die Zellen mit der negativ geladenen Oberfläche (Abbildung 37 B) wachsen etwas schlechter als auf der neutralen, die Zellen auf der positiv geladenen Oberfläche noch etwas schlechter (Abbildung 37 A). Dies ist an den unterschiedlichen Gesamtzellzahlen ersichtlich (neutrale Oberfläche > negativ geladene Oberfläche > positive geladene Oberfläche). In der logarhythmischen Wachstumsphase bis 72h ist innerhalb der einzelnen Oberflächengruppen jedoch kein verändertes Verhalten von Elicitin zur jeweiligen Kontrolle

erkennbar. Danach kommt es bei der negativ geladenen Oberfläche zu einem verzögerten Abschwimmen der Elicitine, bei neutraler Oberfläche (T-25 und 6-Well) (Abbildung 37 C und D) zu einem zeitgleichen Abschwimmen wie die Kontrolle. Bei der positiven Oberfläche ist aufgrund des allgemein verlangsamten Wachstums auch noch bis zum 96h Wert ein logarithmisches Wachstum anzunehmen.



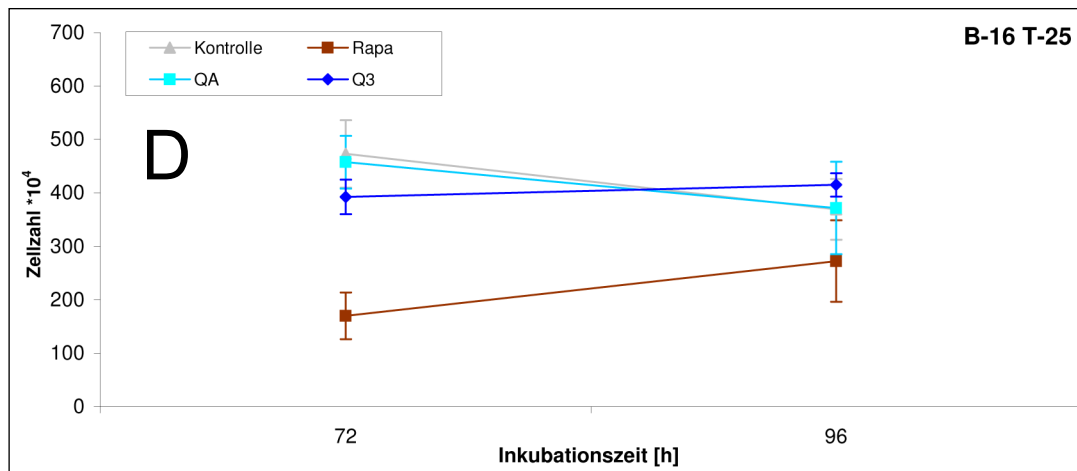


Abbildung 37 Grafische Darstellung von Experiment 15 (El31) an B-16 Zellen zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten ($t = 72\text{h}$ und $96\text{h} \pm \text{SD}$). * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$.

A zeigt eine in 6-wells erstellte Wachstumskurve mit positiver Oberfläche (Aminooberfläche)

B zeigt eine in 6-wells erstellte Wachstumskurve mit negativer Oberfläche (Carboxyoberfläche)

C zeigt eine in 6-wells erstellte Wachstumskurve mit neutraler Oberfläche. Hier zeigt sich das schnellste Zellwachstum im Vergleich zu den anderen verwendeten Oberflächen. Während die Kontroll- und Quercininproben nach 72h abschwimmen, ist bei den Rapamycin-Wells aufgrund der langsameren Wachstumsgeschwindigkeit auch nach 72h noch Wachstum zu verzeichnen.

D zeigt eine in T-25 Flaschen erstellte Wachstumskurve mit neutraler Oberflächen

Die Elicitinkonzentrationen betrugen stets 500 ng/ml, Rapamycin 10 ng/ml. Dargestellt sind die absolut gemessenen Zellzahlen der unterschiedlichen Gruppen. QA bezeichnet ausschließlich mit Anionenaustauscher gewonnenes Quercinin, QA+K bezeichnet zusätzlich mit Anionen- und Kationenaustauscher gewonnenes Quercinin, Q3 bezeichnet bei pH3 isoliertes Quercinin.

3.3.2.2 Versuche mit bei unterschiedlichen pH-Werten isolierten Elicitinen:

Im folgenden Experiment 16 erfolgte die gleichzeitige Testung der bei pH 3, 6 und 8 aufgereinigten Elicitine (=Q3, Q6, Q8) in der höchsten Konzentration von 500ng/ml im direkten Vergleich an B-16-Zellen. Q6 wurde dabei mit Hilfe desselben Aufreinigungsverfahrens gewonnen wie das QI des ersten Screeningexperimentes, das Isolat war jedoch im Gegensatz zu QI für 2 Jahre gelagert. Der Cut-Off Wert des bei pH 6 aufgereinigten Elicitins wurde dabei so verändert, dass sich mehr von den biologisch aktiveren, basischen Elicitine im Isolat befanden.

3.3.2.2.1 Experiment ohne Mediumwechsel, Experiment 16

Nach 48h Einwirkungsdauer von Q3, Q6 und Q8 in Experiment 16 war jedoch bei keinem der Quercinine ein signifikanter Effekt feststellbar (siehe Abbildung 38). Zu diesem Zeitpunkt wäre in Analogie zu den Screeningexperimenten bereits mit starken Zelluntergängen zu rechnen gewesen. Erst beim 72h Wert zeigte sich bei Q3 im Gegensatz zu den anderen beiden Quercininen eine leichte, signifikante Senkung ($p=0,026$), die aber mit -26% weniger Zellen bei weitem nicht an die starke Hemmung von -90% im allerersten Versuch heranreichten. Rapamycin war sowohl nach 48h ($p=0,002$ -58% Hemmung), als auch nach 72h ($p=0,005$ -44% Hemmung) signifikant wirksam.

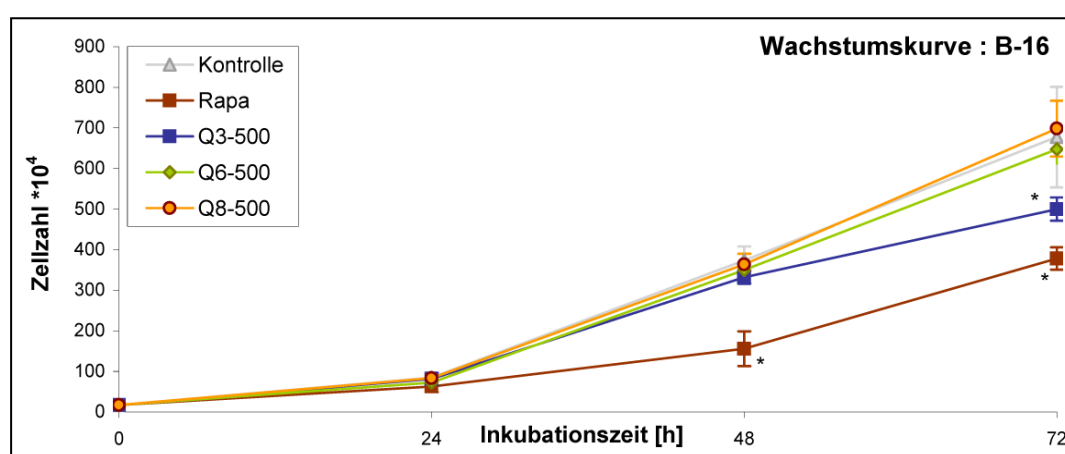


Abbildung 38 Grafische Darstellung von Experiment 16 an B-16 Zellen zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten ($t = 24h, 48h, 72h \pm SD$) unter Verwendung von T-25-Zellkulturflaschen. Es wurden 3 mit jeweils unterschiedlichen Methoden aufgereinigte Quercininchargen verwendet (pH-Wert bei Reinigung betrug 3, 6, 8). Dargestellt sind die absolut gemessenen Zellzahlen der unterschiedlichen Gruppen. * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$.

Eine andere Erklärung, warum Elicitin nicht oder nur noch abgeschwächt wirkte, bot die Theorie, dass Elicitin durch die lange Inkubationszeit bei 37°C instabil wird. Es ist zwar beschrieben, dass kurzzeitig hohe Temperaturen um den Siedepunkt toleriert werden, jedoch sind zu diesem Thema bis jetzt keine Langzeitdaten publiziert worden. Um außerdem sicherzustellen, dass stets genügend Elicitin an den Zellen wirken kann und dieses nicht durch die Zellen oder Proteasen im Medium abgebaut wird, wurde im folgenden Experiment 18 ein täglicher Mediumwechsel durchgeführt.

3.3.2.2.2 Experiment mit Mediumwechsel und hoher Zelldichte, Experiment 17

Hierbei stellte sich heraus, dass der Wechsel des mit Elicitin versetzten Mediums die Proliferation tendenziell eher anregte, da die Q3-500 Flaschen OHNE Wechsel nach 72h in der Tendenz kleinere Zellzahlen aufwiesen als die Flaschen des Q3 MIT täglichem Mediumwechsel (siehe Abbildung 39). Der Mediumwechsel scheint folglich keinen Einfluss auf die Elicitinwirkung zu haben, beziehungsweise scheint der Mediumwechsel die marginalen Quercinineffekte zu kompensieren. Beim 72h Wert wirkte sowohl Q8-500 (-16% Hemmung; $p=0,025$) als auch Q6-500 (14% Hemmung; $p=0,027$), bei denen jeweils kein Mediumwechsel erfolgte. Außerdem wirkte das täglich mit Medium gewechselte Rapamycin nach 72h hochsignifikant mit einer Hemmung von 68%. Q3 ohne Mediumwechsel erreichte, möglicherweise jedoch aufgrund eines großen Fehlerbalkens, keine signifikante Zellzahlsenkung. Es wirkte jedoch tendenziell besser als das täglich Medium-gewechselte Q3. Um sicherzustellen, dass die Wirkung nicht zu einem späteren Zeitpunkt, beziehungsweise erst bei hoher Zelldichte eintritt, wurde von Q3 und Q6 zusätzlich noch ein 96h Wert ausgezählt, wobei sich nur bei Q6-500 ein Effekt zeigte (-28%; $p=0,046$).

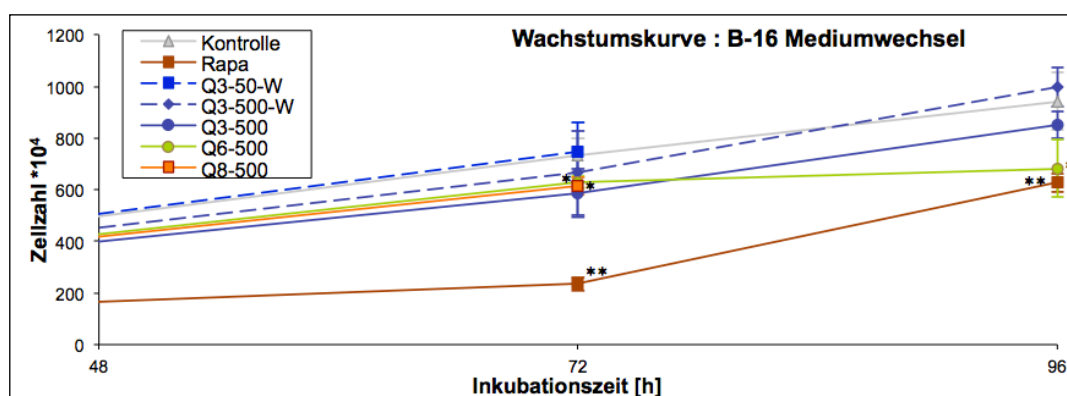


Abbildung 39 Grafische Darstellung von Experiment 17 an B-16 Zellen zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten ($t = 72h$ und $96h \pm SD$) unter Verwendung von T-25-Zellkulturflaschen. Es wurden 3 mit jeweils unterschiedlichen Methoden aufgereinigte Quercininchargen verwendet (pH-Wert bei Reinigung betrug 3, 6, 8), die Flaschen mit täglich gewechseltem Medium wurden mit „W“ bezeichnet. Der Mediumwechsel scheint keinen Einfluss auf die Elicitinwirkung zu haben. Die Messung des 96h-Wertes konnte aus Gründen mangelnder Elicitin-Verfügbarkeit nicht mit Q8-500 und Q3-50-W erfolgen. Dargestellt sind die absolut gemessenen Zellzahlen der unterschiedlichen Gruppen. * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$.

3.3.2.2.3 Experiment mit niedrigen Quercininkonzentrationen, Experiment 18

Ein weiteres Experiment mit jeweils bei unterschiedlichem pH-Wert aufgereinigten Elicitinen war Experiment 18, welches aus mangelnder Verfügbarkeit von Q6 ausschließlich mit Q3 und Q8 durchgeführt wurde. Zusätzlich wurde das Ansprechverhalten der B-16 auf die Konzentration 0,5ng/ml beider Quercinine getestet, da von J.Koehl et al. [24] in der Tabakpflanze eine stärkere Wirkung mit niedrigeren Konzentrationen beschrieben wurde und eine analoge Wirkung bei Tumorzellen zu erwarten gewesen sein könnte. Nach 48h zeigte sich neben der Wirkung von Rapamycin (-40% s) eine Zellzahlminderung von Q3-500 (-13% s) (siehe Abbildung 40 A) und von Q8-5 (-11% s) (siehe Abbildung 40 B). Beide Signifikanzen konnten nach 72h allerdings nicht bestätigt werden, als sich lediglich bei pH3-5 eine signifikante Zellzahlminderung zeigte.

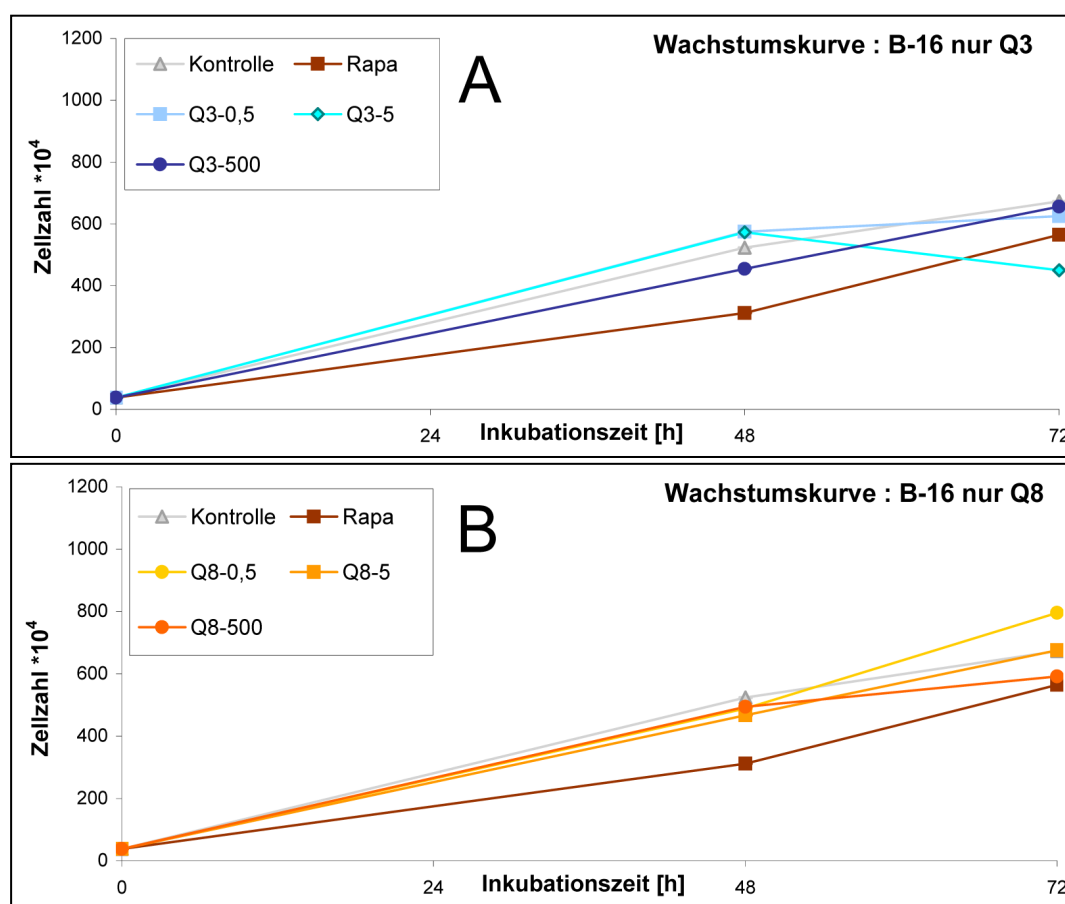


Abbildung 40 Grafische Darstellung von Experiment 18, B-16 Zellen zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten ($t = 48$ und $72\text{h} \pm \text{SD}$) unter Verwendung von T-25-Zellkulturflaschen. Aus Verfügbarkeitsgründen wurden die Experimente ausschließlich mit Q3 (Diagramm A) und Q8 (Diagramm B) durchgeführt und auf 24h-Werte verzichtet. Dargestellt sind die absolut gemessenen Zellzahlen der unterschiedlichen Gruppen für Q3 (A) und Q8 (B). * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$.

T-Test vs. Kontrolle	Rapa	Q3-0,5	Q3-5	Q3-500	Q8-0,5	Q8-5	Q8-500
48h	*			*		*	
72h			*				

3.3.2.3 Versuche mit unterschiedlicher Zelldichte (durch höhere Zelldichte bei Aussaat oder verlängerte Einwirkungszeit)

In der nächsten Versuchsreihe, sollte eine hohe Zelldichte erreicht werden, da der Elicitineffekt bei den ersten Screeningexperimenten ebenfalls bei Subkonfluenz beobachtet wurde. Außerdem liegen die Zellen bei Tabak im Zellverbund vor, sodass dieser Zell-Zell-Kontakt vielleicht den entscheidenden Unterschied in der Wirkung zu isolierten, einzelnen Zellen, wie sie am Anfang der logarithmischen Wachstumsphase zu finden sind, darstellt. Dieses Szenario sollte nun erneut experimentell hergestellt werden, indem eine hohe Zellzahl plattiert wurde, oder die Zellen länger als 72h inkubiert wurden. Bei diesen Versuchen wurden 6-well-Platten verwendet, auf die jeweils ein Ansatz der Kontrolle, Rapamycin, sowie die Elicitine aufgetragen wurden. Bei vorherigen Versuchen waren teilweise Kontrollgruppen auf anderen Platten plattiert als die Elicitingruppen, weshalb die Platten bei der Lagerung eventuell geringfügig anders behandelt worden sein könnten. Durch diese neue Aufteilung wurde eine unterschiedliche Behandlung der Proben ausgeschlossen. Bei allen Experimenten sah man in der logarithmischen Wachstumsphase der Zellen keinen Unterschied zwischen Elicitin und der Kontrolle. Rapamycin zeigte in dieser Phase wie erwartet ein verzögertes Wachstum. Die Zellen schwammen dann jedoch ebenfalls ab, sobald das Well konfluent war, lediglich zeitlich verzögert wie die Zellen der Elicitin- und Kontroll-Wells. Zu diesem Zeitpunkt des Abschwimmens steigt die Anzahl der gemessenen toten Zellen an, während die Zellzahl der vitalen Zellen sinkt. Dieser Sachverhalt ist in den folgenden 4 Experimenten ersichtlich (siehe Abbildung 41-44)

3.3.2.3.1 Experiment 19

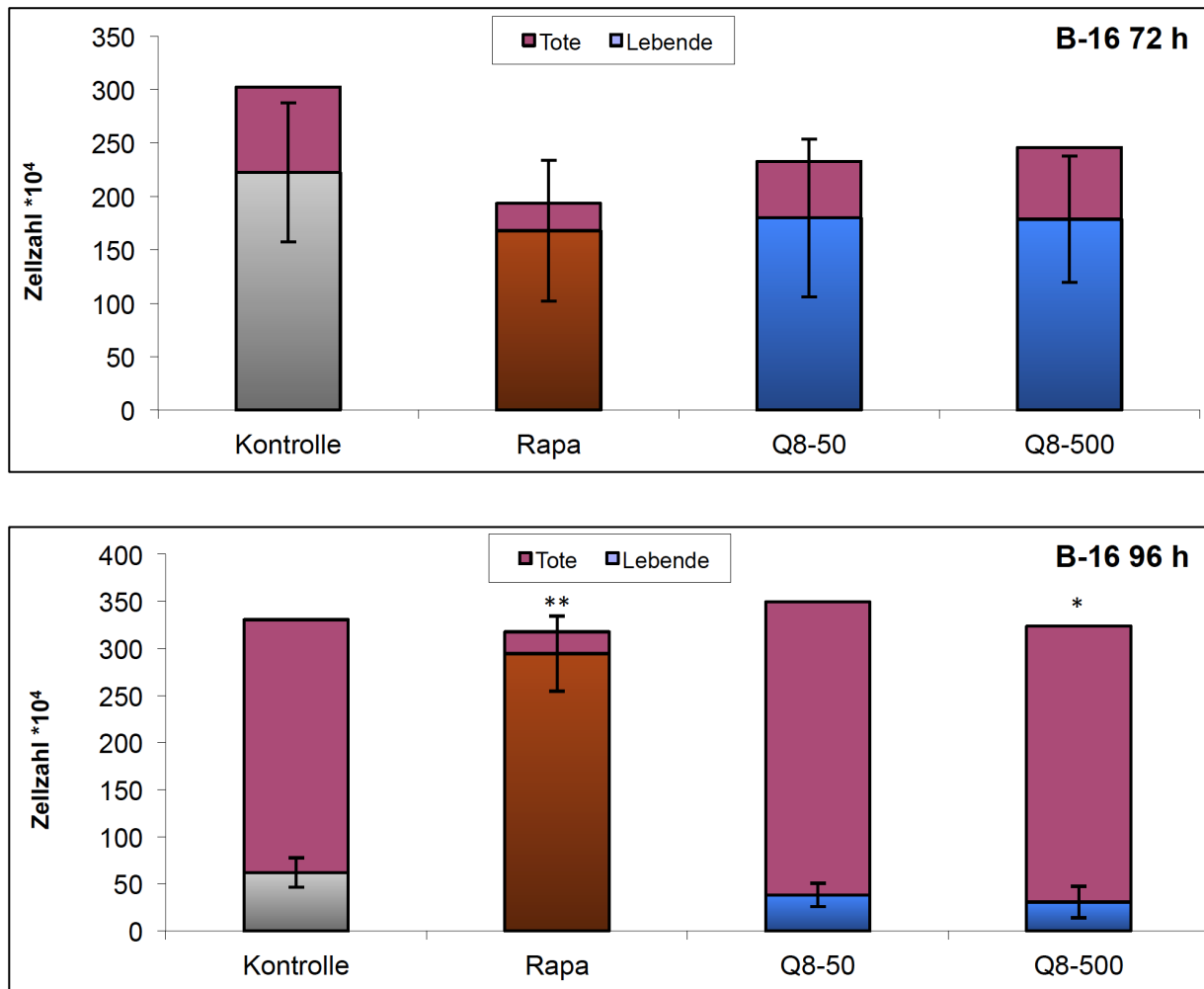


Abbildung 41 Grafische Darstellung von Experiment 19 an B-16 Zellen zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten ($t = 72\text{h}$ und $96\text{h} \pm \text{SD}$) unter Verwendung von 6-Well-Platten. Dargestellt sind die absolut gemessenen Zellzahlen der unterschiedlichen Gruppen. * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$. Durch langsames Wachstum erreichen die Zellen im Rapamycin-Well erst später Konfluenz und schwimmen daher zeitlich verzögert zu den Kontroll- und Quercinierungsgruppen ab.

Im zeitlichen Verlauf zeigt sich das oben beschriebene Phänomen, dass die Zellen nach Erreichen der Konfluenz (zwischen 72h und 96h bei Kontrolle und Elicitin) abschwimmen. Das Rapamycin-Well dagegen ist nach 96h noch nicht konfluent und zeigt höhere Zellzahlen an vitalen Zellen als Kontrolle und Elicitin.

3.3.2.3.2 Experiment 20

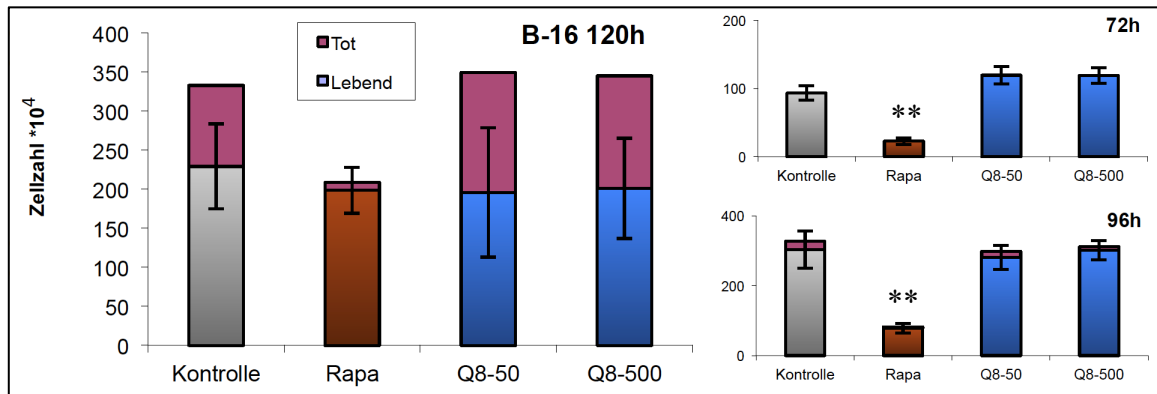


Abbildung 42 Grafische Darstellung von Experiment 20 an B-16 Zellen zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten ($t = 72\text{h}$, 96h und $120\text{h} \pm \text{SD}$) unter Verwendung von 6-Well-Platten. Dargestellt sind die absolut gemessenen Zellzahlen der unterschiedlichen Gruppen. * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$ und ist im Vergleich der lebenden Zellen in Bezug zu den lebenden Kontrollzellen erstellt. Das Rapamycin-Well zeigt abermals ein zeitverzögertes Wachstum. Die Zellzahlminderung der vitalen Zellen bei den Quercinin-Chargen von 96h nach 120h erklärt sich durch verstärkten Zelltod bzw. Abschwimmen der Zellen nach Erreichen der Konfluenz bei ca. $300 \cdot 10^4$ Zellen.

Es ist festzustellen, dass die Wells bei 96h mit ca. $3 \cdot 10^6$ Zellen bereits gleichmäßig gefüllt sind. Beim 120h Wert entspricht die Gesamtzellzahl (vitale und tote Zellen) in etwa dem Gesamtwert bei 96h. Nach 120h stirbt ein Teil der vitalen Zellen dann ab und kann dann als tote Zellen gezählt werden (siehe **Abbildung 42**).

3.3.2.3.3 Experiment 21

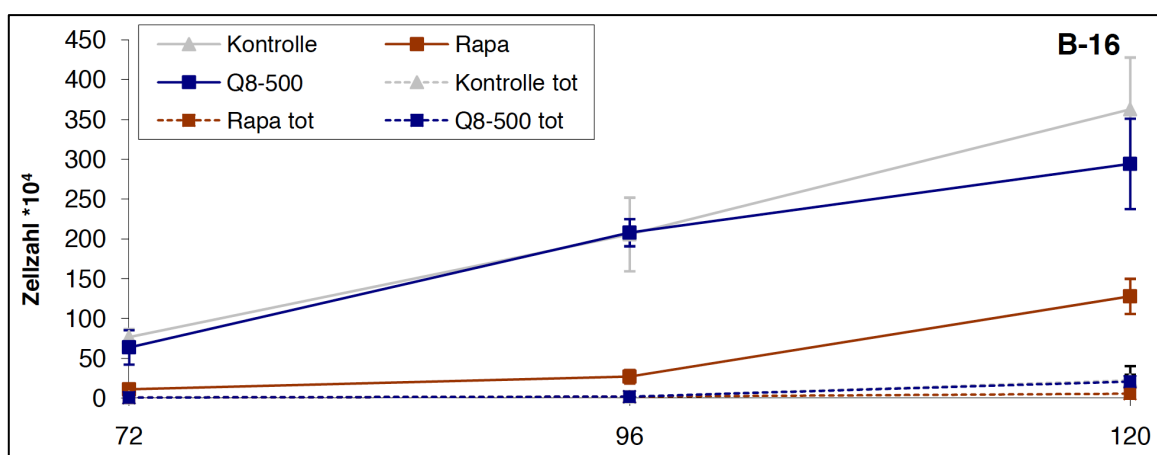


Abbildung 43 Grafische Darstellung von Experiment 21 an B-16 Zellen zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten ($t = 72\text{h}$, 96h und $120\text{h} \pm \text{SD}$) unter Verwendung von T-25-Zellkulturflaschen. Dargestellt sind die absolut gemessenen Zellzahlen der unterschiedlichen Gruppen. Die gestrichelten Linien zeigen den Verlauf der ge-

zählten toten Zellen der Gruppen. * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$ und ist im Vergleich der lebenden Zellen in Bezug zu den lebenden Kontrollzellen erstellt.

3.3.2.3.4 Experiment 22

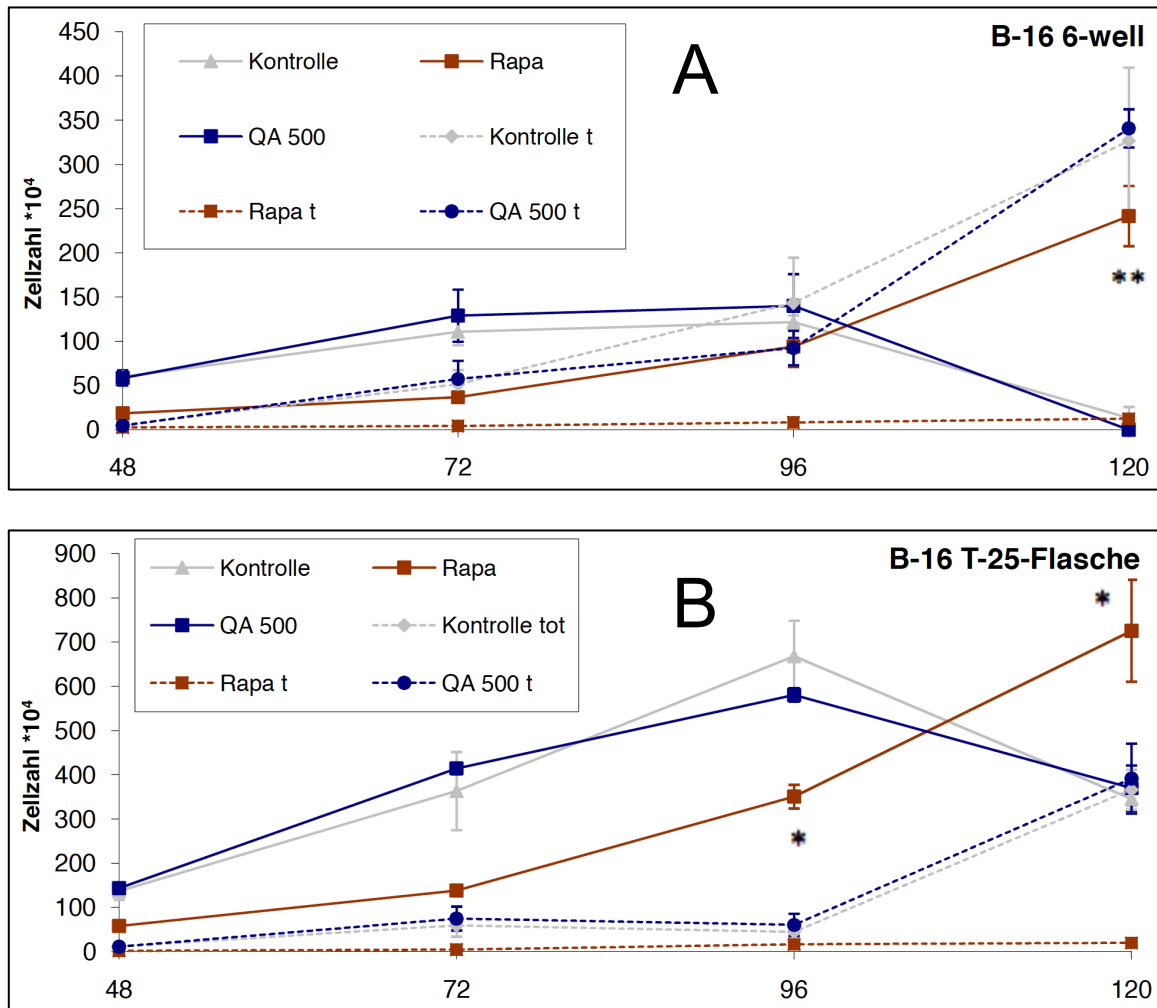


Abbildung 44 Grafische Darstellung von Experiment 22 an B-16 Zellen zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten ($t = 72\text{h}$, 96h und $120\text{h} \pm \text{SD}$). Dargestellt sind die Zellzahlen der vitalen und toten Zellen der unterschiedlichen Gruppen. Die gestrichelten Linien zeigen den Verlauf der gezählten toten Zellen der Gruppen. * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$ und ist im Vergleich der lebenden Zellen in Bezug zu den lebenden Kontrollzellen erstellt.

A zeigt die im 6-Well erstellte Wachstumskurve

B zeigt die in der T-25 Zellkulturflasche erstellte Wachstumskurve

In Experiment 22 (El 32) konnte gezeigt werden, dass das in den Screeningexperimenten in 6-wells gezeigte Abschwimmverhalten (Elicitinwerte sinken, während Rapamycin noch weiter wächst) mit nach oben an die größere Fläche angepassten Zellzahlen auch unter Verwendung von T-25-Flaschen realisiert werden kann (siehe Abbildung 44 B). Bei genauerer Betrachtung

der 6-well-Kurve überrascht, dass der 120h-Wert von Rapamycin höher liegt als die Elicitinwerte von 72h und 96h (siehe Abbildung 44 A), was jedoch so zu erklären ist, dass der Wachstumspeak von Elicitin bereits im Zeitraum zwischen 72h und 96h erreicht wurde und die Zellzahl danach bereits wieder erniedrigt war. Zu erwarten ist ein Abschwimmen bei 6-wells mit B-16 bei einer Zellzahl zwischen 2 und $3 \cdot 10^6$ pro Well. Beim Experiment in T-25 Flaschen, in denen bei einer Zellzahl zwischen $7 \cdot 10^6$ und $8 \cdot 10^6$ mit Abschwimmen zu rechnen ist, wurde der Zeitpunkt des komplett gefüllten Wells beim 96h Wert besser getroffen. In beiden Fällen konnte ein Abschwimmen von Rapamycin nicht gezeigt werden, weil die Versuchsdauer aufgrund des verzögerten Wachstums der Rapamycin-Zellen mit 120h immer noch zu kurz war.

3.3.2.4 Einfluss auf Adhäsionsverhalten, Experiment 23

Der nächste Versuch fungierte als Vorexperiment für hypothetische Experimente über einen noch längeren Versuchszeitraum. Wenn Versuche beispielsweise über mehrere Wochen andauerten, müssten die Zellen für einen Flaschenwechsel abtrypsiniert, dabei kontinuierlich mit Elicitin inkubiert und wieder erneut plattiert werden. Hierbei ist es wichtig, die Bedeutung von Elicitin auf die Zelladhäsion sowie eine eventuelle Beeinflussung der Zelladhäsionsmoleküle zu kennen, was ein verändertes Abschwimmverhalten erklären würde. Wenn davon ausgegangen wird, dass Elicitin wirkt, müsste bei diesem Experiment selbst dann ein Effekt sichtbar sein, wenn die Oberfläche der Wells in Lösung befindliches Elicitin bindet und unwirksam macht: Die Zellen sind in diesem Fall ja bereits mit Elicitin vorinkubiert und zytotoxische bzw. zytostatische Effekte müssten sich bereits vor Kontakt mit den Zellkulturflaschenoberflächen zeigen.

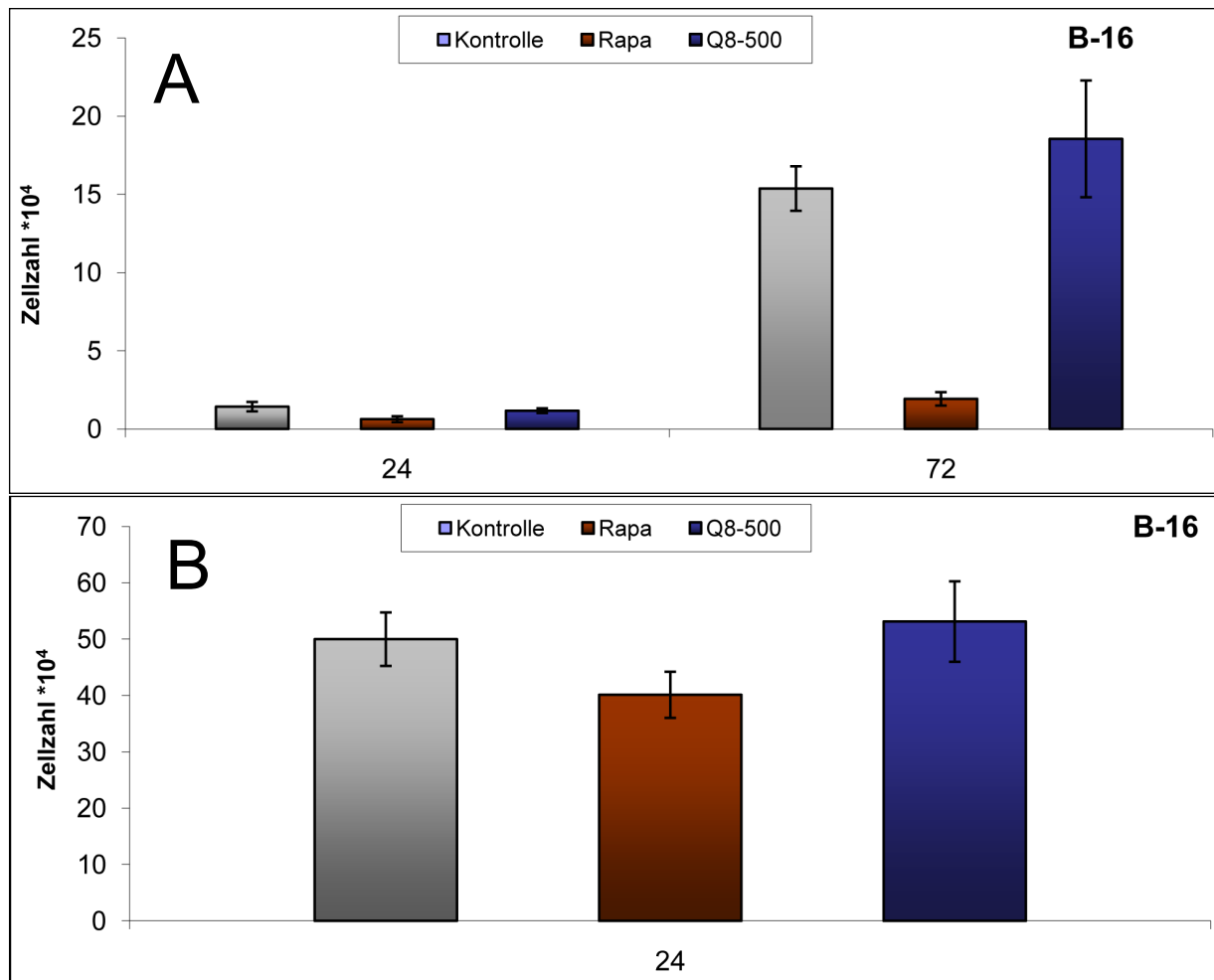


Abbildung 45 Grafische Darstellung von Experiment 23 an B-16 Zellen zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten ($t = 24$ und $72\text{h} \pm \text{SD}$). A zeigt die Zellzahlen bei einer plattierten Zellzahl von 10 000, B zeigt Zellzahlen bei einer plattierten Zellzahl von 500 000. * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$

Im Experiment traten jedoch keine zur Kontrolle veränderten Elicitin-Werte auf. Aufgrund der größeren Zellzahl, die bei Experiment „B“ plattiert wurde (500 000 Zellen im Vergleich zu 10 000 bei „A“) entspricht „B“ bezüglich der Dichte einem späteren Zeitpunkt im Diagramm „A“: Kontrolle und Elicitin sind bis zur Wellfüllung gewachsen und schwimmen ab, während Rapamycin zeitverzögert gleich reagiert und ebenfalls abschwimmt (siehe Abbildung 45).

3.3.2.5 Einfluss der Lyophilisation auf Elicitinaktivität, Experimente 24 und 24'

Im Screeningexperiment wurde nicht-lyophilisiertes Elicitin verwendet. Um sicher zu gehen, dass der Prozess des Lyophilisierens keinen Einfluss auf die Elicitinaktivität hat, wurde ein

erneuter Versuch mit nicht-lyophilisiertem Elicitin durchgeführt. Außer dem wahrscheinlich durch einen technischen Fehler bedingten Ausreißer des nicht-lyophilisierten Q50 bei 72h sind keine signifikanten Elicitinwerte gemessen worden (siehe Abbildung 46).

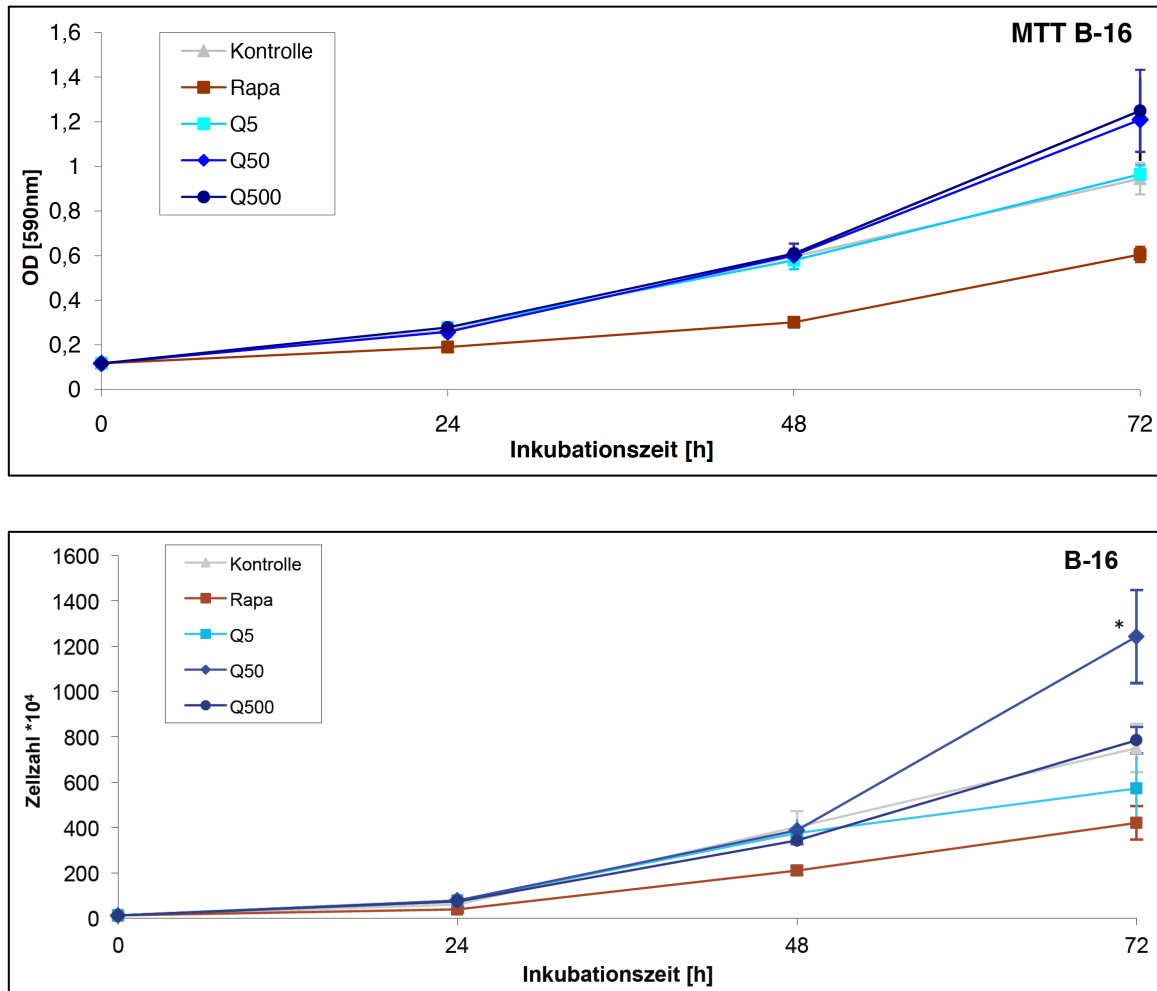


Abbildung 46 Grafische Darstellung von Experiment 24 an B-16 Zellen mit nichtlyophilisiertem Elicitin zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten ($t = 24\text{h}$, 48h und $72\text{h} \pm \text{SD}$). Dargestellt sind die absolut gemessenen Zellzahlen der unterschiedlichen Gruppen. Die * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; $** P \leq 0,001$. Der Ausreißer bei Q50 nach 72h ist wahrscheinlich durch einen technischen Fehler bedingt, ansonsten könnten auch durch die Verwendung von nicht-lyophilisiertem Quercinin keine reproduzierbaren Zellzahlsenkungen erreicht werden.

Der ebenfalls durchgeführte MTT mit nicht-lyophilisiertem Elicitin zeigte neben signifikanten Werten für Rapa lediglich nach 72h eine Aktivitätserhöhung für die beiden höchsten Quercinine (Abbildung 47).

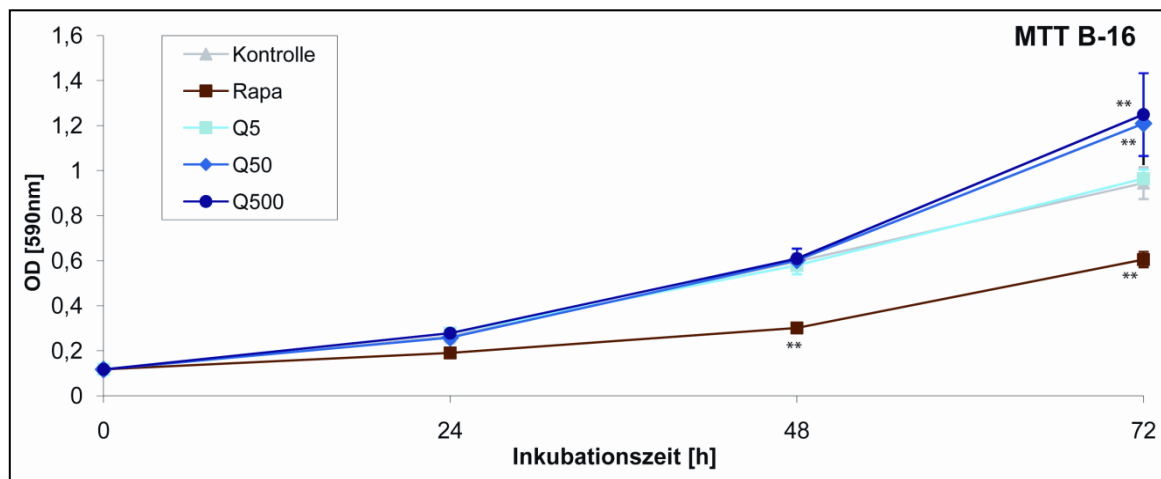


Abbildung 47 Grafische Darstellung von Experiment 24' mit B-16. Gezeigt ist die gemessene optische Dichte bei 590nm zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten ($t = 24\text{h}, 48\text{h}, 72\text{h} \pm \text{SD}$). * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$.

Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse:

- Der zellzahlsenkende Effekt von Elicitin konnte in der starken Ausprägung, wie er bei der ersten Versuchsreihe auftrat, nicht reproduziert werden, jedoch wirkte Q500ng/ml in einigen Versuchen (Experimente 2a, 13, 18) bei B-16-Zellen nach 48h. Diese Wirkung fiel in späteren Experimenten jedoch stets deutlich schwächer aus als in den Screeningexperimenten. Bei gestressten Zellen scheint Elicitin darüber hinaus einen stärkeren Effekt zu zeigen. (Experiment 13)
- Auch bei CT-26 konnten die starken Wirkungen der ersten Versuchsreihe nach 72h nicht reproduziert werden und es zeigten sich in den 2 Folgeversuchen höchstensfalls Tendenzen in unterschiedlichen Konzentrationen.
- Mit bei pH 6 und 8 aufgereinigten Elicitinen konnten zwar in einem Experiment signifikant erniedrigte Zellzahlen gemessen werden (wirkt in höchster Konzentration zwar in Experiment 17, nicht mehr aber in Experiment 18), jedoch war die dort beobachtete Wirkung dann deutlich schwächer als damals in den Screeningexperimenten 2a und 2b.
- Der täglich durchgeführte Mediumwechsel erbrachte keine Verbesserung des Elicitinwirkungsgrades.
- Die im MTT-Assay gemessene Gesamtaktivität der Zellen war mit Ausnahme von Versuchen mit QI der ersten gelieferten Charge zelllinienübergreifend gegenüber der Kontrolle unverändert oder aber signifikant bzw. tendenziell erhöht.
- Mit Ausnahme von HEK steigert Elicitin die mitochondriale Aktivität pro Einzelzelle in allen Experimenten zelllinienübergreifend.
- Lediglich in der ersten Versuchsreihe mit QI aus einem aktiven Phytophthoraisolat zeigten sich bei Elicitin der Konzentration 500ng/ml signifikante aktivitätshemmende Tendenzen bei CT-26 und B-16 sowohl nach 48h, als auch nach 72h. Bei HUVECs, Keratinozyten und TMK-1 konnte in keinem Versuch eine QI induzierte Hemmung der Zellaktivität festgestellt werden.

- Bei den durchgeführten Westernblots zeigte sich keine eindeutige Regulierung bei Caspase-3, JNK und p38. Es ist jedoch möglich, dass p70S6 und p44/42 unter Quercinineinfluss leicht nach unten reguliert werden.
- Elicitin induziert keine extrazellulär messbare H₂O₂-Bildung.
- In der FACS-Analyse lässt sich bei B-16-Zellen keine im Vergleich zur Kontrollprobe veränderte apoptotische Wirkung nach 72h Inkubation feststellen.

4. DISKUSSION

4.1 ALLGEMEINER TEIL

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Elicidine Quercinin und Citricolin auf Wachstum, Proliferation, Vitalität und Signaltransduktion der verwendeten Zellen *in vitro* untersucht. In Anlehnung an die Experimente mit Quercinin in Tabakzellsuspensionen wurden in den meisten Experimenten die Konzentrationen 5, 50 und 500ng/ml eingesetzt. Dies entspricht dem optimalen Wirkungsbereich in der Tabakzellkultur [24]. In den anfänglichen Experimenten mit unseren Zelllinien zeigte sich zunächst eine potente Proliferations- und Aktivitätshemmung. In den Folgeexperimenten wurden die Effekte der beiden Elicidine Quercinin und Citricolin, insbesondere jedoch von Quercinin, mit unterschiedlichen Methoden experimentell untersucht, jedoch konnte die starke Wirkung der ersten Experimente (mit Verwendung von QI) nicht verlässlich reproduziert werden. In einigen Versuchen zeigten sich zwar leichte Effekte von Quercinin in den Wachstumskurven, jedoch hat es in der aktuellen Form und Aufreinigung wenig biologische Relevanz als neues Antitumorthapeutikum. In der Analyse aller durchgeführten Experimente konnte keine Systematik der Wirkung in den Ergebnissen festgestellt werden und es ist darüber hinaus nicht vorstellbar, dass die experimentübergreifenden Schwankungen der gemessenen Ergebnisse durch systematische oder technische Fehler aufgetreten sind. Denkbar ist jedoch, dass die Probenzahl zu klein war, um die marginalen Effekte statistisch signifikant nachzuweisen. Falls die Effekte in nachfolgenden Experimenten mit verbessert wirksamem Elicitin stabil reproduziert werden können, stellt das Thema durchaus ein interessantes Gebiet für weitere Forschungen in der Zukunft dar.

4.2. DISKUSSION DER METHODEN

Die Versuche wurden in Dreifachwiederholungen durchgeführt. Wäre eine größere Probenzahl verwendet worden, hätte es zu lange gedauert die Zellzählung in der standardisierten Inkubationszeit durchzuführen. Obwohl sich in der statistischen Auswertung einzelner Versuche teilweise signifikante Elicitinwirkungen zeigten, ist deren biologische Relevanz nicht gesichert, weil sie in Wiederholungsexperimenten nicht reproduziert werden konnten. Das Proliferations- und Wachstumsverhalten wurde dabei mit mehreren, unterschiedliche Parameter messenden, Methoden untersucht. In den erstellten Wachstumskurven sieht man beispielsweise sehr gut, ob Wirkstoffe einen Einfluss auf die Anzahl der Tumorzellen haben. Diese Größe ist auch klinisch äußerst relevant, da die Zellzahl mit der Tumorgroße korreliert.

Der Nachteil dieser Methodik ist jedoch, dass im Fall einer Zellzahlsenkung gegenüber der Kontrolle nicht zu erkennen ist, ob die Zellen apoptotisch werden oder nur langsamer proliferieren. Für die Behandlung von Tumoren wäre es jedoch möglich, sowohl apoptose-induzierende als auch proliferationshemmende Effekte therapeutisch zu nutzen. Beide Effekte können durch die Methodik der Wachstumskurve gezeigt werden. Ein weiterer Nutzen der Zellzahlbestimmung ist die optische Kontrolle der Wells unter dem Mikroskop, d.h. man kann in einigen Fällen bereits durch die Zellmorphologie (z.B. verstärkte Vakuolisierung) erkennen, ob und wie stark die Zellen gestresst sind.

Neben der Zellzahlbestimmung wurde mit dem MTT-Assay eine Methodik gewählt, mit der die Rückschlüsse auf die mitochondriale Aktivität und somit auf die Zellvitalität gezogen werden können. Darüber hinaus liefert der MTT-Assay indirekt auch Hinweise auf die Zellzahl, da eine größere Anzahl von Zellen eine höhere Gesamtzahl an Mitochondrien aufweisen, mit denen der MTT Farbstoff quantitativ umgesetzt werden kann. Die Menge des gemessenen Farbstoffs entspricht dabei der Glykolyserate der Zellen per se. Demzufolge stellt der MTT-Assay ein indirektes Maß für die Proliferation der Zellen dar, da proliferierende Zellen im Allgemeinen über eine höhere mitochondriale Aktivität verfügen als beispielsweise kontaktinhibierte Zellen.

Da die gemessene Gesamt-OD des MTT-Assays nun von der Gesamtzahl der Mitochondrien abhängt, ist der Quotient aus Gesamt-OD / Zellzahl eine gute Größe, um Rückschlüsse auf die Stoffwechselaktivität der einzelnen Zelle ziehen zu können. Ein Nachteil des MTT-Assays (sowohl Gesamt-OD Messung als auch OD / Einzelzelle) ist jedoch, dass durch die ausschließliche Messung des Stoffwechselaktivität keine kausale Aussage darüber gemacht werden kann, ob die Zelle nun keine messbare Stoffwechselaktivität mehr zeigt, weil sie apoptotisch ist, oder weil der Stoffwechsel (z.B. durch Kontaktinhibition) nach unten reguliert ist und dadurch weniger Farbstoff umgesetzt wird. Aus diesem Grunde schlossen sich zur genaueren Beurteilung von Apoptose und Proliferationsverhalten zusätzliche durchflusszytometrische Experimente mit CFSE und dem Apoptosemarker 7AAD an.

4.3 DISKUSSION DER EINZELNEN ZELLINIEN

4.3.1 B16

Zunächst wurde in ersten Screeningexperimenten untersucht, wie die murinen B-16 Melanomzellen auf antiproliferative Substanzen ansprechen. Dass die in unseren Laboratorien verwendeten Versuchsbedingungen prinzipiell für den Umgang mit antiproliferativen Stoffen und Zellkultur optimiert sind, sieht man an der experimentübergreifend signifikant bis hochsignifikant erniedrigten mitochondrialen Aktivität in den Versuchen 2a, 2b und 9 bei Rapamycin, sowie im Versuch 1 bei Azathioprin. Neben der verminderten mitochondrialen Aktivität zeigte sich in den Wachstumskurven ein ähnliches Bild. So waren die Rapamycinwerte in den mit B-16 Zellen erstellten Wachstumskurven in 12 von 14 durchgeführten Zellzahl-experimenten (Versuch 2a, 12a, 13, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22, 23, 24) signifikant bis hochsignifikant vermindert, sofern die Zellen in der Phase des logarhythmischen Wachstums gezählt wurden und die Kontrollproben noch nicht abgeschwommen waren. In den Experimenten 9 und 19 war immerhin eine antiproliferative Tendenz der Rapamycinprobe zu erkennen.

Mit Elicitin Q wurden insgesamt 13 Wachstumskurven mit B-16 erstellt (Experimente 2a, 9, 12a, 13, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24), wobei signifikant gesenkte Zellzahlen in 6 Wachstumskurven vorkamen (Experimente 2a, 13, 16, 17, 18, 19). In den übrigen Kurven konnten allenfalls Tendenzen festgestellt werden, die teils nach unten (Experimente 9, 12a) oder nach oben ausfielen (Experiment 18). Hier war keine Regelmäßigkeit bezüglich der Wirkungsweise ersichtlich, da die Signifikanzen teilweise in der höchsten Q-Konzentration 500ng/ml zu beobachten waren (Experimente 2a, 13, 16, 17, 18, + Trend in 12a) und teilweise in der niedrigeren Konzentrationen von 5ng/ml (Experiment 18 + Trend in 9) auftraten. Trotz einer Vielzahl durchgeführter Experimente konnte der zellzahlreduzierende Effekt von QI-500ng/ml in Experiment 2a mit -90% gegenüber der Kontrolle, welcher Rapamycin (-62%) sogar übertraf, in keinem der nachfolgenden Versuche reproduziert werden. Die signifikante Zellzahl-erhöhung bei Q50 in Experiment 24 ist dabei wahrscheinlich durch einen technischen Fehler bedingt. Wenn signifikant erniedrigte Werte auftraten, wurden diese Effekte jeweils bei unterschiedlich aufgereinigten Elicitinen beobachtet (Aufreinigung jeweils bei anderem pH), die jeweils einen unterschiedlich großen Anteil an den verstärkt wirksamen basischen Elicitinen hatten. Mit keiner dieser Aufreinigungen konnten zuverlässig reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden, wie folgende Zusammenstellung verdeutlicht:

Q3 wirkte in den Experimenten 13, 16, 18, nicht aber in 9, 12a und 17.

Q6 wirkte in den Experimenten 2a und 17, nicht aber in Experiment 16.

Q8 erzielt Signifikanzen in den Experimenten 17, 18 und 19 (nur bei einem Zeitwert), jedoch nicht in den Experimenten 16, 20, 21, 22, 23, 24.

Auch bezüglich des *Wirkzeitpunktes* gab es keine klar reproduzierbaren Ergebnisse:

Q3 wirkte (in 3 von 6 durchgeführten Experimenten): nach 24h (Experiment 13), 48h (Experimente 13, 18) oder 72h (Experimente 16, 18).

Q6 wirkte (in 2 von 3 durchgeführten Experimenten): nach 48h (Experiment 2a), 72h (Experiment 17) und 96h (Experiment 17).

Q8 wirkte (in 3 von 9 durchgeführten Experimenten): dabei jeweils einmal nach 48h (Experiment 18), 72h (Experiment 17) und 96h (Experiment 19).

Es ist daher wahrscheinlich, dass ein marginaler elicitininduzierter Effekt vorliegt. Jedoch war nicht erkennbar, warum die „Schwelle“ zur statistischen Signifikanz nur in einigen Experimenten überschritten wurde, in anderen allerdings nicht.

Um die Zellkulturbedingungen den nährstoffarmen Bedingungen anzupassen, welche im Zentrum mancher Tumoren vorherrschen, wurden Diätexperimente mit unterschiedlichen FCS-Serum-Konzentrationen durchgeführt. Dabei gilt als wissenschaftlich gesichert, dass ein hypoxisches Tumormilieu die Ansprechbarkeit auf Chemotherapeutika erhöhen kann [98]. Eventuell kann dies ebenfalls durch Diät und dadurch induzierten Stress erreicht werden. Unter diesem experimentell simulierten Nährstoffmangel unter Diät zeigte sich nach 48h (0% FCS) eine erhöhte Ansprechbarkeit der Zellen auf Q3, wohingegen in den Q3-Proben mit 1% oder 10% FCS keine signifikanten Zellzahlsenkungen festzustellen waren. Auch die in anderen Experimenten durchgeführten Medienwechsel führten zu keiner verbesserten Quercininwirkung. In Experiment 16 zeigte sich sogar, dass Q3-500 ohne Wechsel tendenziell besser wirkte als die Q3-500 Proben *mit* täglichem Mediumwechsel, wenn auch nicht signifikant.

Bei den täglich gewechselten Q3-50 Proben zeigte sich keine Abweichung gegenüber der Kontrolle.

Neben den Quercinin-Wachstumskurven wurde ebenfalls eine Wachstumskurve unter Citricolinexposition angefertigt, wobei sich in der optischen Kontrolle kein Effekt zeigte. Somit ist die beim anschließenden Auszählen erhaltene verringerte Zellzahl in Experiment 2a (48h) wahrscheinlich durch einen technischen Fehler bedingt.

Abgesehen von den B-16 Wachstumskurven wurden zusätzlich noch 4 MTT-Assays mit Quercinin durchgeführt, wobei sich auch hier keine Systematik einer reproduzierbaren Wirkung ausmachen lässt: Während sich in 2 Versuchen eine hochsignifikante elicitininduzierte Senkung der mitochondrialen Aktivität gegenüber der Kontrolle zeigte (Experimente 2a und 3a), war einmal der gegenteilige Effekt einer Aktivitätserhöhung zu beobachten (Experiment 24'). In diesen beiden Experimenten mit gesenkter Aktivität war QI der ersten Charge verwendet worden. Der MTT mit Q3 (Experiment 9), welches in den späteren Versuchen verwendet wurde, zeigte keinen Effekt.

Da mit QI der ersten Charge auch bereits in der Wachstumskurve eine starke Zellzahlverminderung zu beobachten war, die in diesem Ausmaße zu keinem späteren Zeitpunkt reproduzierbar war, ist davon auszugehen, dass die Zusammensetzung dieser ersten Charge gegenüber der Zusammensetzung anderer Chargen verändert war, wie in Punkt 4.5 erläutert wird. In dem mit Citricolin durchgeführten MTT (Experiment 2a) zeigte sich ausschließlich beim 24h Wert eine Aktivitätssenkung der höchsten beiden Konzentrationen, die jedoch zu späteren Zeitpunkten nicht mehr zu beobachten waren. Beim 48h Wert war wiederum unerwarteter Weise die niedrigste C-Konzentration aktivitätsgemindert, was jedoch wahrscheinlich auf einen technischen Fehler zurückzuführen ist. Anschließend wurde die Gesamt-OD durch Quotientenbildung ebenfalls auf die Einzelzell-OD umgerechnet. Hierbei zeigte sich in Versuch 7 eine gleichmäßige Abnahme der auf die Einzelzelle bezogenen mitochondrialen Aktivität bis zum 48h-Wert. Danach zeigte sich ein erneuter Anstieg aller Q-Konzentrationen sowie der Kontrolle, der möglicherweise mit einem Stoffwechselboost der präterminalen Zellen kurz vor dem Abschwimmen assoziiert ist. Lediglich Rapamycin lieferte weiterhin hochsignifikant erniedrigte Werte nach 72h. Dies ist damit zu erklären, dass Rapamycin in den Zellen einen Zellzyklusarrest induziert und die Zellstoffwechselaktivität hemmt.

CFSE und 7AAD (Experiment 14)

Da die im MTT untersuchte mitochondriale Aktivität nicht zwangsläufig etwas über das Proliferationsverhalten der B-16 aussagt, wurden zusätzlich CFSE-gefärbte Tumorzellen mittels FACS untersucht und deren Apoptoseverhalten mittels 7AAD beurteilt. In der CFSE-Untersuchung war der Peak nach 72h jedoch unerwarteterweise nicht nur bei Elicitin, sondern auch bei Rapamycin in seiner Gesamtheit nach links in Richtung der ungefärbten Zellen verschoben, wodurch sich ein im Vergleich zur Kontrolle identisches Bild des Proliferationsverhaltens zeigte. Weil außerdem keine Peaks der durch Teilung entstandenen Tochtergenerationen zu sehen waren, könnte man einerseits davon ausgehen, dass B-16 CFSE abbauen oder durch Reflux wieder ausscheiden. Sollte dies der Fall sein, wären B-16 für CFSE-Proliferationsuntersuchungen nicht gut geeignet. Andererseits wäre jedoch auch denkbar, dass Rapamycin in diesem Fall eher Zelltod als eine Proliferationshemmung induziert. In diesem Szenario wären ebenfalls keine Tochtergenerationen im Rapamycin-Well zu sehen gewesen, weil die Zellen sich nicht weiter teilen würden, sondern direkt zu Grunde gingen.

Extrazelluläre H_2O_2 -Messung (Experiment 10)

In den extrazellulär durchgeführten H_2O_2 -Messungen konnten keine signifikanten elicitinbedingten Veränderungen gegenüber der Kontrolle festgestellt werden. Dies könnte nun beispielsweise daran liegen, dass Quercinin ROS-Bildung in Säugerzellen nicht oder nicht ausreichend induziert, um sie mit unserer Methodik nachzuweisen. Ferner könnten ROS im Säuger direkt wieder abgebaut werden oder ausschließlich intrazellulär zu bleiben, wo sie durch die von uns verwendete Methode dann nicht detektierbar wären [99; 100]. Die in der Pflanze beschriebenen ROS produzierenden NADPH-Oxidasen sind ferner auch bei Säugerzellen beschrieben (z.B. in Neutrophilen Granulozyten oder Colonepithel-Zellen [101]). Es ist jedoch möglich, dass diese NADPH-Oxidase des Säugers phylogenetisch zu weit von denen der Phytophthora entfernt ist und Elicitin diesen nicht bindet bzw. aktiviert. Es ist außerdem bekannt, dass ROS antiapoptotische Effekte induzieren kann. So wurde bei Pankreas-CA-Zellen nachgewiesen, dass ROS über den AKT/apoptosis signal-regulating kinase 1 pathway Apoptose der Zellen inhibieren kann [102]. Es könnte folglich also ebenfalls sein, dass sich die unterschiedlichen Wirkarten von Elicitin gegenseitig kompensieren und z.B. eine proapoptotische Tendenz (z.B. durch Mikrotubulizerstörung oder MAPK-Kaskaden) durch eine antiapoptotische Wirkung (z.B. durch ROS-bedingte antiapoptose pathways über AKT)

kompensiert wird und letztendlich kein signifikanter Effekt hinsichtlich Zellzahl oder Proliferation gemessen werden kann.

Eine andere Überlegung für die Elicitinwirkung im Screeningexperiment war, dass die Zellen unter Elicitineinfluss früher abschwimmen als dies die Zellen aus den Rapamycin- und Kontrollwells tun. Aus diesem Grund wurden Versuche angeschlossen, in denen am Anfang der Experimente eine erhöhte Zellzahl plattiert wurden. Mögliche kausale Erklärungen für das Abschwimmen der elicitinbehandelten Zellen könnten dabei sein, dass Elicitin das Zellwachstum leicht stimuliert oder aber die Lag-Phase verkürzt und in den Elicitin-Wells deswegen schneller die zum Abschwimmen benötigte Zelldichte erreicht wird. Andererseits könnte Elicitin auf die Zellen im konfluenten Well eine Wirkung in Richtung Apoptose oder ein verbessertes Abschwimmverhalten (z.B. durch Beeinflussung von Adhäsionsmolekülen) haben.

Dieses hypothetische Szenario, dass die Elicitinzellzahl durch Abschwimmeffekte bedingt unterhalb der Rapamycinzellzahl liegt, konnte in den Versuchen 15, 19, (normale Oberfläche) und 22 (A+B) gezeigt werden. Allerdings konnte in keinem der 4 Experimente (15, 19, 22A, 22B) das Ergebnis wiederholt werden, dass Elicitin signifikant sowohl unter den Kontrollwerten als auch unter Rapamycin liegt, wie ursprünglich in den Screeningexperimenten beobachtet. An B-16 wurden des Weiteren wichtige Vertreter jener intrazellulären Signalkaskaden in Westernblots untersucht (Experiment 11), über die eine mögliche Elicitinwirkung vermittelt werden könnte. Die zwei mit B-16-Zelllysaten durchgeführten Westernblots zeigten dabei jedoch keine Aktivierung der pro-apoptotisch wirksamen MAPK p38, der an Zelldifferenzierung und Proliferation beteiligten MAPK p44/42 und der pro-apoptotisch wirksamen MAPK JNK. Bei der in den AKT/mTOR-Pathway eingebundenen p70S6-Kinase, welche ebenfalls einen Einfluss auf das Proliferations- und Transkriptionsverhalten der B-16 Zellen hat, konnte in einem Experiment eine schwache Regulation nach unten gezeigt werden, die jedoch im zweiten Experiment nicht reproduzierbar war.

4.3.2 CT-26

Neben B-16 wurde mit CT-26 noch eine weitere murine maligne Zelllinie untersucht, die bereits von Beginn der ersten Experimente mitbenutzt wurde. CT-26 sind dabei nicht so sensitiv und empfindlich wie B-16 Zellen, reagieren jedoch ebenfalls sehr gut auf antiproliferativ

wirkende Substanzen. So konnten in allen MTT-Assays (Experimente 2b, 6, 7) und in 3 von 4 Wachstumskurven (Experimente 2b, 2b', 7, 6) signifikante und hochsignifikante Werte unter Rapamycinbehandlung beobachtet werden. Insgesamt wurden 3 Q-Wachstumskurven mit CT-26 erstellt. Im ersten Experiment 2b mit QI-500 der ersten Charge konnte eine dosisabhängige Zellzahlverringering von -32% (bei QI-50) und -62% (bei QI-500) beobachtet werden, deren Signifikanz jedoch aufgrund einer Einfachzählung nicht beurteilbar ist. In den zwei Folgeversuchen (6, 7) mit Q3 konnten jedoch keine signifikanten quercininbedingten Senkungen reproduziert werden (die knapp signifikante Senkung bei 24h war durch einen technischen Fehler bedingt).

Neben Wachstumskurven mit Quercinin wurden auch 2 Wachstumskurven mit Citricolin erstellt (Experimente 2b und 2b'), die ebenfalls unterschiedlich ausfielen. Während sich in Experiment 2b nach 48h keine deutliche und aufgrund der Einmalzählung darüber hinaus statistisch nicht beurteilbare, minimale Zellzahlsenkung zeigte (-10% in der höchsten Konzentration), war in Experiment 2b' bis auf eine signifikante Senkung nach 24h kein Effekt zu beobachten. Wie auch bei B-16 wurden MTT-Assays mit Quercinin an CT-26 durchgeführt. Wie zuvor bei den B-16-MTT-Assays, zeichnete sich hier ebenfalls ein sehr inhomogenes Bild der Ergebnisse ab. Während im Experiment mit QI (Experiment 2b) nach 48h und 72h signifikante bis hochsignifikante Aktivitätsminderungen in der höchsten Konzentration feststellbar waren, waren in den zwei Folgeversuchen mit Q3 (Experiment 6, 7) nach 72h signifikante Aktivitätserhöhungen feststellbar. Im Vergleich der beiden Versuche mit Q3 ist auffällig, dass einmal Aktivitätssenkungen nach 24h und 48h zu beobachten sind (Experiment 6), während in der Wiederholung (Experiment 7) signifikant erhöhte Werte zu diesen Zeitpunkten auftraten. Obwohl darauf geachtet wurde, dass die Zellzahl beim Ausplattieren, sowie der Zustand der Zellen bei den Versuchen identisch ist, ist vorstellbar, dass diese experimentell festgestellten Verhaltensabweichungen durch gleichwohl minimalste Zellzahlschwankungen zu Stande kommen könnte.

Neben den Versuchen mit Quercinin wurde auch ein MTT-Assay mit Citricolin durchgeführt (Experiment 2b). Während die höchste Konzentration (500ng/ml) über alle Zeitpunkte hinweg unveränderte Werte zeigte, waren in den niedrigsten Konzentrationen zuerst verringerte (24h und 48h) und später erhöhte Aktivitäten (72h) messbar. Diese Aktivitätserhöhung ist möglicherweise erneut durch einen Zell-Zellkontakt-bedingten Stimulus im konfluenten Well erklärbar.

Bei der Quotientenbildung aus Gesamt-OD und Wachstumskurvenzellzahl zeigte sich in beiden Q3-Experimenten (Experimente 6, 7) ein wirres Bild von zeitlich aufeinanderfolgenden unsystematischen signifikanten Aktivitätssteigerungen und –minderungen sowohl bei den Rapamycin- als auch bei den Quercininproben. Dies könnte ursächlich durch die Tatsache bedingt sein, dass CT-26 zu Zellverklumpungen neigen, die es erschweren, gleichmäßige Werte zu messen.

4.3.3 LLC-1

Als dritte murine maligne Zelle wurden LLC-1 mit Q3 untersucht. Wenn Elicitin gut auf LLC-1 gewirkt hätte, wäre es möglich gewesen, die mit zwei unterschiedlichen Farben gefärbten Dual color-Varianten der LLC-1 Zellen mittels live cell imaging auf ihr Proliferationsverhalten zu untersuchen und somit eine wertvolle Aussage über den Elicitineinfluss auf die Zellproliferation zu erhalten. In Experiment 8 traten in der Wachstumskurve bis auf den verminderten Q50-Wert nach 24h keine gegenüber der Kontrolle signifikanten Werte ein. Die mitochondriale Gesamtaktivität veränderte sich entweder nicht oder nahm absolut und im Vergleich zur Kontrolle gesehen zu, wobei hier jedoch kein konzentrationsabhängiges Verhalten beobachtet werden konnte. Möglicherweise steigert Quercinin hier folglich die mitochondriale Aktivität, ohne jedoch Einfluss auf die Zellzahl zu haben. Die erhöhte mitochondriale Aktivität pro Einzelzelle beim 72h Wert spricht für diese These.

4.3.4 TMK-1

Zusätzlich zu den murinen Zelllinien wurden als humane maligne Zellen TMK-1 in 2 Experimenten untersucht. Auch TMK-1-Zellen sind prinzipiell sehr gut zur Untersuchung antiproliferativer Substanzen geeignet. So zeigten sich in allen durchgeführten Experimenten signifikante Aktivitätsminderungen im MTT (Experimente 1, 2c, 4) und verringerte Zellzahlen in der Wachstumskurve bei Verwendung von Rapamycin und Azathioprin. In der Wachstumskurve mit Quercinin (Experiment 4) war eine Zellzahlverringering der höchsten Konzentration zu beobachten, die mit $p=0,047$ knapp signifikant gegenüber der Kontrolle war, jedoch signifikant schlechter als Rapamycin wirkte.

Während sich in den mit Quercinin durchgeführten MTT-Assays (Experimente 2c, 4) keine deutlichen Veränderungen von Quercinin gegenüber der Kontrolle zeigten, war die OD/Zelle

die ersten 48h signifikant erhöht und glich sich nach 72h den Kontrollwerten an. Im Gegensatz zu Quercinin zeigte Citricolin keinen Effekt an TMK-1 (MTT in Experiment 2c).

Um zu untersuchen, wie Elicitin neben den eben erwähnten malignen Zellen auf benigne Zellen wirkt, wurden humane Keratinozyten aus der Epidermis, sowie humane Nabelschnur-endothelzellen verwendet.

4.3.5 HUVECs

In dem mit HUVECs durchgeführten MTT-Assay (Experiment 3b) waren nach 48h weder bei der Referenz Rapamycin, noch bei QI der ersten Charge Veränderungen gegenüber der Kontrolle zu erkennen. Da sowohl Rapamycin als auch das QI bei anderen Zelllinien eine Wirkung zeigte (nicht jedoch bei HUVECs), ist davon auszugehen, dass HUVECs nicht auf den Wirkmechanismus dieser Substanzen ansprechen.

4.3.6 HEK

Als weitere benigne Zelle wurden HEK untersucht. In diesem Rahmen wurden 2 Experimente mit HEKs, darunter 2 Wachstumskurven (Experimente 3c, 5) und ein MTT (Experiment 5) durchgeführt, wobei Rapamycin stets gesenkte Werte zeigte. Während die Zellen der Rapamycingruppe in Experiment 5 durch das verzögerte Wachstum adhärent blieben, erreichte sowohl die Kontrollgruppe als auch Q3 der niedrigsten Konzentration nach 48h Konfluenz, woraufhin die Zellen abschwammen. Die höchste Konzentration Q3-500 schien das Keratinozytenwachstum darüber hinaus beim 48h Wert zu stimulieren. Unklar jedoch bleibt, warum die beiden höchsten Q3-Konzentrationen nach 48h nicht abschwimmen wie dies bei der Kontrolle und der niedrigsten Q3-Konzentration zu sehen ist. Da bei Rapamycin der proliferationshemmende Effekt gegenüber dessen zelltötender Wirkung dominiert, wachsen die Zellen lediglich langsamer, die Konfluenz wird später erreicht und die Keratinozyten schwimmen nach 48h noch nicht ab. Zusätzlich zu der Wachstumskurve wurde in Versuch 5 ein MTT-Assay erstellt, der eine leichte Q-bedingte Erhöhung der Gesamt-OD zeigte.

4.4 ZUSAMMENFASSENDE VERGLEICH DER 4 TUMORZELLINIEN B-16, CT-26, TMK-1 UND LLC-1 MITEINANDER

4.4.1 ZELLZAHL

Im Vergleich der verschiedenen Tumorzelllinien B-16, CT-26, TMK-1 und LLC-1 miteinander konnte abschließend kein Muster in der Wirkungsweise von Elicitin erkannt werden. Bei keiner der Zelllinien konnte ein zuverlässig reproduzierbares Ergebnis hinsichtlich eines immer gleichen Zeitwertes, einer bestimmten Elicitinkonzentration oder einer bestimmten Elicitincharge erreicht werden. Da unsere Zellkulturbedingungen möglicherweise von den Bedingungen im Tumor abweichen, wurden in weiteren Experimenten mit B-16 folgende Parameter variiert: das Timing (zusätzlich 96h und 120h-Werte), die anfangs plattierte Zellzahl, sowie der FCS-Gehalt des Mediums und die Bioverfügbarkeit von Elicitin (durch Verwendung höherer oder niedrigerer Konzentrationen). Hier sah man bei auf Diät gesetzten B-16, die zuvor mit 0% FCS gestresst wurden, einen Effekt (Experiment 13) von Q3. Elicitin scheint also bei sehr stark gestressten Zellen einen leichten Effekt zu haben.

4.4.2 MTT

Die QI-bedingte Aktivitätsminderung der Experimente 2a-c mit B-16 konnte unter Verwendung des gleichen Elicitins in Experiment 3a einmal mit B-16 und CT-26 reproduziert werden. Unter Verwendung der Chargen aus gelagerten Isolaten konnten in den Folgeexperimenten diese Ergebnisse weder mit B-16 noch mit den anderen Zellen signifikante Aktivitätssenkungen reproduziert werden. Stattdessen war entweder eine signifikante Aktivitätserhöhung (Experimente 4 (TMK-1), 5 (HEK), 7 (CT-21), 8 (LCC-1)), keine Aktivitätsänderung (Experiment 9 (B16)), oder aber ein gemischtes Bild aus Aktivitätssenkungen und Aktivitätserhöhungen in den unterschiedlichen Konzentrationen (Experiment 6 (CT-26)) gegenüber der Kontrolle festzustellen. Eine zelllinienübergreifende Korrelation zwischen beobachteter gesenkter Zellzahl und einem aktivitätsgeminderten MTT war ausschließlich mit QI aus dem aktiven Isolat erzielt worden: Sowohl in Experiment 2a (B-16) als auch in Experiment 2b‘ waren verringerte Zellzahlen, sowie eine Verringerung der Gesamt-OD beobachtbar. Wurden andere Quercinin Chargen verwendet, war im MTT-Assay entweder eine Aktivitätserhöhung (Experiment 9 (B-16)), oder keine signifikante Änderung gegenüber der Kontrolle festzustellen (Experimente 7 (CT-26) und 8 (LLC-1)), während die Zellzahl der Quercinin-

proben keine signifikanten Werte zeigte. Auch diese Beobachtung spricht dafür, dass die Zusammensetzung der ersten Charge von der der übrigen Chargen abweichen könnte. Eine weitere Korrelation zwischen einer gemessenen erniedrigten Zellzahl und verringerter MTT-OD zeigte sich in Experiment 6 (CT-26), wobei die Zellzahländerung ($p=0,047$) hier nur beim 24h Wert zu beobachten war und gemessene Änderungen zu dieser Zeit erfahrungsgemäß wenig aussagekräftig sind.

4.4.3 MTT/EINZELZELLE

Beim Vergleich der auf die Einzelzelle bezogenen OD-Werte des MTT-Assays fällt auf, dass Quercinin eine im Vergleich zur Kontrolle zellübergreifende Steigerung der mitochondrialen Aktivität bei allen verwendeten malignen Zellen induziert. Dabei scheint irrelevant zu sein, wie sich die Zellzahlen in der Wachstumskurve verhalten. So wurde bei TMK-1 (Experiment 4) eine erhöhte OD pro Einzelzelle gemessen, obwohl die Quercinin-Wachstumskurvengesamtzellzahl gegenüber der Kontrolle vermindert war. Andererseits wurde die erhöhte OD auch gemessen, wenn die Quercinin-Wachstumskurvengesamtzellzahl mit den Kontrollwerten identisch war, wie beispielsweise bei den Experimenten 7 (CT-26), 8 (LLC-1) und 9 (B-16) ersichtlich. Schlussfolgernd liegt die Vermutung nahe, dass Quercinin die mitochondriale Aktivität unabhängig vom Füllungsgrad des Wells, bzw. unabhängig von Proliferationsphasen wie Lag-Phase / positive Wachstumsphase / stationäre Phase zu steigern vermag.

Diese im MTT messbare, erhöhte mitochondriale Aktivität geht wie oben erwähnt mit einer erhöhten Energieproduktion von NADPH und ATP einher, die ursächlich entweder durch einen erhöhten Glucoseverbrauch, oder durch einen effektiveren metabolischen Stoffwechsel bedingt sein kann. Es ist ferner seit Längerem bekannt, dass Stoffwechselwege in Tumorzellen modifiziert und in ihrer Effizienz gegenüber nicht-malignen Zellen verändert sein können. So beschrieb der Biochemiker und Arzt Otto Warburg bereits 1924, dass der Tumorzellstoffwechsel oftmals von einer bezüglich der Energieausbeute effektiven Atmungskette, die meistens in nicht-malignen Zellen vorkommt, auf die weniger effektive anaerobe Milchsäuregärung mit Laktatproduktion umgestellt ist. Diese Stoffwechselumstellung hängt dabei mit der malignen Entartung (z.B. von p53) zusammen [103; 104]. In den Warburg-Effekt bestätigenden Experimenten konnte neuerdings gezeigt werden, dass das Tumorstoffwechselwachstum gezielt gehemmt werden kann, wenn der zelluläre Stoffwechsel mittels Frataxin obligat in Richtung

aerober Energiegewinnung verschoben wird [105; 106; 107]. In Experimenten zeigte sich darüber hinaus, dass Tumorzellen trotz der ineffektiveren Laktatproduktion *in vivo* einen Überlebensvorteil haben (durch bis dato nicht komplett verstandene Transmitterfunktionen von Laktat *in vivo*), welcher *in vitro* nicht zu zeigen war (persönliche Kommunikation Dr. Gudrun Koehl und Prof. Dr. Marina Kreutz). Sollte die im MTT gemessene Erhöhung der Energieproduktion nun auch mit einem erhöhten O₂-Umsatz verbunden sein, könnte es unter Umständen sein, dass Elicitin den Warburg-Effekt mindern und auf diese Weise antiproliferative Effekte aus-üben könnte. Wenn sich das ursprünglich wirksame Elicitin mit seiner eingangs gezeigten Aktivität wieder synthetisieren ließe, könnten sich aus diesem Grund zukünftige experimentelle Untersuchungen, wie Messungen des mitochondrialen O₂-Verbrauches, oder quantitative Bestimmungen von LDH sowie Glucosetransportern anschließen.

4.5 FAZIT UND AUSBLICK

Es bleibt unvollständig geklärt, weshalb die Elicitinwirkung des ersten Experimentes nicht reproduziert werden konnte. Denkbar wäre, dass dies durch etwaige Verunreinigungen oder andere technische Fehler bedingt sein könnte. Gleichfalls könnte es sein, dass die B-16 weiter mutiert sind und nicht mehr auf antiproliferative Substanzen wie Elicitin ansprechen [108]. Da Elicitin auch bei anderen Zelllinien später keine eindeutigen Effekte induzierte und die B-16 regelmäßig neu aufgetaut wurden, ist dies jedoch unwahrscheinlich.

Eine andere Erklärung, warum Elicitin bei Säugerzellen nicht den gewünschten Effekt zeigt, könnte in den möglicherweise zu großen phylogenetischen und morphologischen Unterschieden zwischen pflanzlichen und mammaliären Zellen liegen. So könnten unterschiedliche Strukturelemente (fehlende Zellwand bei Säugerzellen) und in der Kausalkette der Elicitinwirkung integrale Bestandteile wie z.B. spezifische Elicitinrezeptoren, NADPH-Oxidasen, Effekte von ROS, Mikrotubuli oder MAP-Kinasen bei Säugern und Pflanzen zu stark differieren.

Exemplarisch gesprochen könnte der spezifische, elicitinbindende Rezeptor beim Säuger fehlen, oder die bei Inkubation vorherrschenden, unterschiedlichen pH-Werte ein geändertes Bindeverhalten von Elicitin am Rezeptor bewirken. Wie in der Einleitung erwähnt, erfolgt die beste Elicitinbindung an den pflanzlichen Rezeptor bei pH 7, während die Säugerzellen bei

pH 7,4 inkubiert wurden. Bei diesem pH-Wert gingen in der Pflanze nur noch halb so viele Elicitinmoleküle eine Rezeptor-Ligand-Interaktion ein. Eventuell müsste infolgedessen die Konzentration in weiteren Experimenten nochmals stark gesteigert werden um einen vergleichbaren Effekt zu erreichen. Ferner könnte es sein, dass die zytotoxische Wirkung nur unter Lichtexposition zu Stande kommt. Dieses Phänomen ist bei Tabak beschrieben, wo Nekrosephänomene ausschließlich auftraten, wenn die Pflanzen sowohl Elicitin als auch UV-Licht ausgesetzt waren [25]. Da die Säugerzellen in einem abgedunkelten Brutschrank inkubiert wurden, wäre dies eine denkbare, jedoch unwahrscheinliche Erklärung für das Ausbleiben des gewünschten Effektes, zumal bei den Screeningexperimenten ebenfalls ein zytotoxischer Effekt auch ohne UV-Licht-Exposition beobachtet worden war. Ferner könnte die lichtgekoppelte pflanzliche HR bei Säugerzellen auch deshalb nicht möglich sein, weil dort essentielle, für Lichtreaktionen notwendige Strukturen und Organellen, wie beispielsweise zur Photosynthese notwendigen Chloroplasten, nicht angelegt sind. Ferner könnten verschiedenartig regulierte Stoffwechselreaktionen der Grund für aberrante Elicitinwirkungen bei Pflanzen und Säugern sein, wie zum Beispiel eine unterschiedlich regulierte Glykolyse oder ein anderer biochemischer Umgang mit Sauerstoff [109].

Neben all diesen, auf unterschiedlicher Morphologie, Phylogenetik, Physiologie und Biochemie basierenden Überlegungen, die Resultate der ersten Experimente zu erklären, gab es noch ein weiteres Erklärungsmodell, wie beispielsweise zeitlich divergentes Abschwimmen: Denkbar ist, dass Elicitin das Wachstum dahingehend ändert, dass die Wells schneller konfluent werden und die Zellen nachfolgend abschwimmen, z.B. entweder durch generell schnelleres Wachstum oder einer kürzeren Lag-Phase. Unterdessen ist das Zellwachstum der Rapamycinproben angesichts seiner wachstumshemmenden Eigenschaften zeitlich verzögert. Dadurch, dass Elicitin und die Kontrolle in den Experimenten mit hoher Zelldichte meist zur gleichen Zeit abschwammen und lediglich die Rapamycinzellzahlen erhöht waren (weil sie noch nicht abgeschwommen waren wie die Kontroll- und Quercininproben), ist auch diese Überlegung eher unwahrscheinlich (Abbildung 48). Die im Screeningexperiment gezeigte Verknüpfung von normalen Kontrollzellzahlen und gesenkten Elicitin- und Rapamycinwerten konnte nicht reproduziert werden.

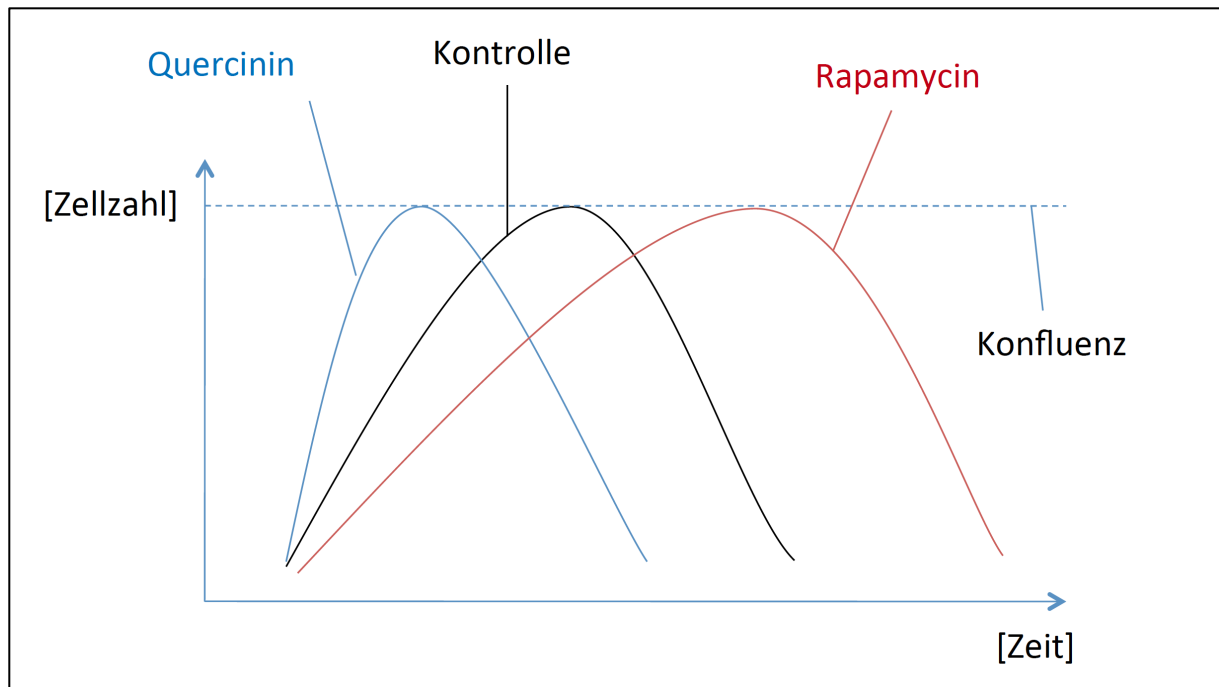


Abbildung 48 Darstellung der Abschwimmhypothese. Die Zellen schwimmen nach Erreichen der Konfluenz ab. Quercinin erreicht schneller Konfluenz als die Kontrolle und Rapamycin und schwimmt deshalb schneller ab. In den ersten Experimenten könnte die Zellzahl am Schnittpunkt zwischen der roten und der blauen Kurve bestimmt worden sein: Quercinin ist wieder erniedrigt (Zellen schwimmen gerade ab), Rapamycin ist noch niedrig (wegen verlangsamten Wachstums) und die Kontrolle wächst in normaler Geschwindigkeit.

In Abschnitt 4.2.2 wurde erwähnt, dass das Quercinin aus einem aktiven Isolat bezüglich seiner biologischen Potenz höchstwahrscheinlich von den anderen Chargen abweicht. Dieser Aspekt rechtfertigt einen genaueren Blick in die Herstellungsweise dieses ersten Stoffes: Die in den Experimenten 1-3 verwendete aktive Elicitinfraktion wurde aus einem *P. quercina* Isolat gewonnen, das mehrmals den Wirt, die Stieleiche (*Quercus robur*), infizierte und aus infizierten Wurzeln reisoliert wurde (siehe 2.1.1). Die im Tumortest nicht mehr aktive Elicitinfraktion stammte aus dem gleichen *P. quercina* Isolat, allerdings wurde dieses für zwei Jahre in der Mykothek aufbewahrt und hatte während der Lagerung keinen Kontakt zur Wirtspflanze. Interessanterweise zeigt die isoelektrische Fokussierung für die aktive Elicitinfraktion drei basische Hauptproteine mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten ($pI=7.7$, $pI=8.9$; $pI=9.5$; data not shown, pers. Mitteilung Prof. Dr. Oßwald), wobei für die inaktiven Elicitinfraktionen nur noch ein basisches Protein mit $pI=7.7$ detektiert wurde (siehe Abbildung 49). Die beiden weiteren basischen Formen fehlen.

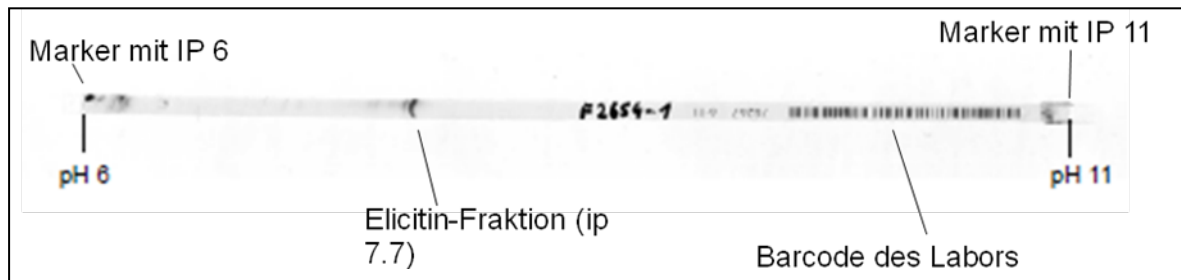


Abbildung 49 Isoelektrische Fokussierung einer inaktiven *P. quercina* Elicitinfraktion (Elicitingewinnung siehe 2.1.2.3). Während bei Elicitin des aktiven Isolates unterschiedliche Banden in der isoelektrischen Fokussierung sichtbar waren, zeigte sich in der Analyse des später verwendeten Elicitins nur eine einzige Bande (Isoelektrischer Punkt bei 7.7).

Eine mögliche Erklärung für das Fehlen der beiden basischen Proteine in der Elicitinfraktion von *P. quercina* könnte auf das Phänomen des “gene silencing“ zurückgehen: So ist erwiesen, dass *Phytophthora* durch lange Aufbewahrung in der Mykothek (ohne aktiven Kontakt zu ihren Wirtspflanzen), bestimmte Gene spezifisch abschalten und die Expression der entsprechenden Proteine unterdrücken können (pers. Mitteilung Prof. Dr. Oßwald). Dies würde bedeuten, dass die initial gemessene Antitumoraktivität womöglich auf die beiden Elicitine mit den isoelektrischen Punkten 8.9 und 9.5 zurückginge. Um die Versuche der Screeningexperimente zu reproduzieren und statistisch zu sichern, könnte das Ziel sein, ein aktives, frisches *P. quercina* Isolat aus infizierten Eichenwurzeln aus dem Freiland zu gewinnen und dieses auf sein Elicitinmuster mit Hilfe der isoelektrischen Fokussierung zu überprüfen. Sollten sich die drei basischen Elicitne wieder nachweisen lassen, so wäre ein erneuter Test auf Antitumoraktivität sinnvoll.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Ungeachtet neuester Errungenschaften auf dem Gebiet der medizinischen Forschung steigen die globalen krebsbedingten Todesfälle stetig an und es gilt, kontinuierlich neue Medikamente zu entdecken und zu entwickeln, die eine Antitumorthérapie effizienter, nebenwirkungsärmer oder überhaupt erst möglich machen. Diese pharmakologische Weiterentwicklung konnte im Laufe der Geschichte bereits vielfach durch den Einsatz pflanzlicher oder pilzlicher Stoffe erzielt werden. Die von der pflanzenschädigenden Protisten-Gattung *Phytophthora* sezernierten Elicidine induzieren dabei Zelltod in Pflanzen über dieselben Mechanismen, die auch bei Säugern existieren, wodurch denkbar ist, dass diese elicidininduzierten zytotoxischen Effekte auch beim Menschen therapeutisch genutzt werden können. Elicitin aus unterschiedlichen Isolaten, welches nach unterschiedlichen Protokollen aufgereinigt wurde, wurde im Rahmen dieser Arbeit folglich auf unterschiedlichen murinen und humanen Säugerzellen mit unterschiedlichen Methoden getestet. Methodisch wurden dabei mit Zellzahlbestimmungen, MTT-Assays, Westernblots, extrazellulären H_2O_2 -Messungen und FACS-Analysen unterschiedlichste Techniken verwendet, um die Zellproliferation, die Zellvitalität, das Apoptoseverhalten und die intrazelluläre Signaltransduktion genauer zu untersuchen. Im ersten Experiment konnte mit Elicitin aus einem aktiven *P. Quercina* Isolat eine Wirkkombination von gesenkter Zellzahl einerseits, sowie gleichzeitig gesenkter mitochondrialer Aktivität andererseits, erzielt werden. Dies konnte mit keiner anderen Quercinincharge in diesem Ausmaße zuverlässig reproduziert werden. Als kausale Erklärung hierfür sind mehrere Gründe denkbar, die teilweise im Elicitin selbst, in zu großen Unterschieden zwischen pflanzlichen und Säugerzellen bzw. deren Inkubationsbedingungen oder Adhäsionsphänomenen zu suchen sind. Genauer gesagt könnte Quercinin durch lange Zeit der Wirtsabstinenz durch genesilencing an säugerzellspezifischer Aktivität verloren haben. Oder aber die phylogenetische Andersartigkeit bezüglich Rezeptoren, Proteinen, intrazellulären Signaltransduktionsbestandteilen, andere Stoffwechselregulationen (z.B. abweichende Glykolyseregulation [109]) oder aber morphologische Differenzen (Zellwand vs. Plasmamembran, Energiegewinnung vorwiegend in Chloroplasten vs. Mitochondrialer Atmungskette) zwischen pflanzlichen und Säugerzellen sind zu groß. Desweiteren könnten die Begründung für die fehlende Wirkung in verschiedenen Inkubationsbedingungen (Einfluss von UV-Licht und Differenzen beim pH-Wert) sowie Abschwimmphänomenen (Elicitin induziert leichtes Wachstum, die Zellen schwimmen früher ab

und täuschen in der Zellzahlbestimmung dadurch eine verminderte Zellzahl vor) zu suchen sein.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Elicitin unter den bisherigen Bedingungen keine zuverlässig reproduzierbaren, starken zytotoxischen Eigenschaften entfalten konnte. Falls jedoch das ursprüngliche Elicitinexpressionsmuster wie bei der ersten Charge wieder hergestellt werden kann, wäre eine erneute Testung auf Antitumoraktivität sehr interessant und sinnvoll.

6. LEBENSLAUF

Persönliche Angaben:

Geboren: 27.06.1985 in Sigmaringen
Staatsangehörigkeit: deutsch

AUSBILDUNG

09/2005 - 06/2012 **Studium der Humanmedizin, Universität Regensburg**

Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung: Note 2,5
Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung: Note 1,5
Gesamtnote: Note 1,8

09/1995 - 06/2005 **Gymnasium Mengen, Mengen (Baden-Württemberg)**

Allgemeine Hochschulreife: Note 1,4

09/1991 - 06/1995 **Grundschule Mengen**

BERUFSERFAHRUNG UND PRAKTIKA

Praktisches Jahr

02/2011 - 06/2011 **1. Tertial: Chirurgie**

Amala Medical College, University of Calicut, Kerala (Indien)
Universitätsklinikum Regensburg

06/2011 - 10/2011 **2. Tertial: Innere**

Universitätsspital Zürich
Universitätsklinikum Regensburg

10/2011 - 1/2012 **3. Tertial: Radiologie**

University of California, San Diego (Kalifornien, USA)
Universitätsklinikum Regensburg

Famulaturen

03/2010 **Universitätsklinikum Regensburg,**
Abteilung für Radiologie

02/2010 **Universitätsklinikum Regensburg**
Abteilung für Innere Medizin

10/2009 - 11/2009	Universidad del Desarrollo / Clinica Alemana , Santiago de Chile Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe
08/2009 - 09/2009	Universidad del Desarrollo / Clinica Alemana , Santiago de Chile Abteilung für Innere Medizin
02/2009 - 03/2009	Universitätsklinikum Regensburg Abteilung für Viszeralchirurgie
08/2008 - 09/2008	Sozialmedizinisches Zentrum Ost , Wien Abteilung für Unfallchirurgie

FREMDSPRACHEN

Deutsch:	Muttersprache
Englisch:	verhandlungssicher
Spanisch:	verhandlungssicher
Französisch:	gute Grundkenntnisse

STIPENDIEN

10/2011-12/2011	Stipendiat “Undergraduate Student Exchange Program“ , University of California, San Diego
06/2011	Stipendiat der Nachwuchsförderung „Hellste Köpfe für die Radiologie“ , Deutsche Radiologische Gesellschaft
06/2009 -02/2010	Stipendiat “Internationalisierung der Hochschulen” des DAAD (Deutscher Akademischer Auslandsdienst)

SONSTIGES

Musikalische Ausbildung (Klavier):

1991 – 2005	Auszeichnungen: Gewinner des WDR-Klassikpreis (2004), Rundfunkmitschnitte, drei erste Bundespreise bei Musikwettbewerb „Jugend Musiziert“ u.a. Konzerte: Carnegie Hall New York, Konzerthaus Berlin, serbisches Parlament in Belgrad, Tschechien, Türkei, Vietnam, Chile etc.
-------------	--

7. DANKSAGUNG

In besonders großem Ausmaße möchte ich mich hiermit bei Herrn Prof. Dr. Edward Geissler für die Aufnahme in seine experimentelle chirurgische Forschungsgruppe an der Klinik und Poliklinik für Chirurgie der Universität Regensburg unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Hans Schlitt bedanken. Ebenso gebührt Herrn Prof. Dr. Wolfgang Oßwald (Departement für Ökologie, TU-München) größter Dank. Sowohl Prof. Geissler als auch Prof. Oßwald waren stets als Ansprechpartner für die Diskussion aktuell aufkommender, fachlicher Fragen und Probleme zu erreichen und boten auch außerhalb der gewöhnlichen Arbeitszeiten stets ihre engagierte Unterstützung an. Sie vermittelten mir einen tiefen Einblick in die Art und Weise Forschung zu betreiben und wissenschaftlich zu denken. Vielen Dank an dieser Stelle auch explizit noch einmal an Prof. Dr. Oßwald für die Herstellung und Aufreinigung von Elicitin, sowie die ständige schnelle Nachlieferung, die in Notfällen nicht selten auch persönlich mit dem Auto erfolgte. Weiterhin möchte ich mich herzlichst bei meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Gudrun Köhl bedanken. Sie führte mich gewissenhaft und geduldig in die verwendeten Arbeitstechniken ein, vermittelte mir grundlegendes experimentell-wissenschaftliches Wissen und war für Fragen und Probleme technischer, theoretischer oder organisatorischer Natur, die während den Experimenten oder beim Erstellen dieser Dissertation auftraten, stets als kompetenter Ansprechpartner zu erreichen. Auch während ihres Urlaubes und spät abends konnte man sich ihrer Hilfe gewiss sein.

Des Weiteren möchte ich mich bei Anna Höhn bedanken, die mich in einige Arbeitstechniken einführte und zusammen mit Dr. Marc Bleischwitz bei der Organisation und Durchführung vieler Experimente sehr unterstützte. Das große Arbeitspensum wäre ohne ihrer beider Hilfe sicher nicht zu bewältigen gewesen. Vielen Dank auch an Dr. James Hutchinson und Dr. Paloma Riquelme für die Unterstützung bei der Durchführung und Analyse der FACS-Versuche. Meiner Arbeitsgruppe möchte ich hier nicht versäumen, für die angenehme und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre zu danken. Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern Ulla und Dieter Mross bedanken, die mir das Studium überhaupt erst ermöglichten, mich jederzeit bei zu treffenden Entscheidungen unterstützten, an meine Fähigkeiten glaubten und mir bei der Korrektur dieser Arbeit zur Seite standen.

8. MATERIALIEN

Die verwendeten Substanzen, Zellkulturbedarf und Geräte wurden wie folgt bezeichnet und von den erwähnten Firmen bezogen. Die Reihenfolge entspricht der des obigen Textes und wurde dort in Klammern angegeben.

8.1 SUBSTANZEN UND ZELLKULTURBEDARF

Kürzel im Text	Produktbezeichnung	bezogen von
[M1] B16	Murine B16-F10 Melanomzellen aus C57BL/6J-Mäusen	freundlichst überlassen von Prof. Dr. D. Männel, Universität Regensburg
[M2] CT-26	Colon-Adenocarcinomzellen	BALB/c-Maus
[M3] TMK-1	Humane Magencarcinomzellen	bezogen von Eiichi Tahara, University of Hiroshima, Hiroshima, Japan
[M4] HUVECs	proliferating human umbilical vein endothelial cells	Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland
[M5] Keratinozyten	Human Epidermal Keratinocytes, neonatal, cryopreserved vial Cat: C-001-5C	Cascade Biologics, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany Cat: C-001-5C
[M6] LLC1	Lewis Lung Carcinom	ATCC, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110, USA
[M7] Medium für HUVECs	Endothelial Cell Basal Medium	Promocell GmbH Heidelberg Deutschland C22210 500ml

[M9]	L-Glutamine	L-Glutamine	Biochrome AG, Berlin, Deutschland
[M10]	FCS	Fetal Calf Serum	Biochrome AG, Berlin, Deutschland
[M11]	Penicillin-Streptomycin	Penicillin-Streptomycin	Gibco, Paisley, Scotland, U.K
[M12]	Vitamine	MEM Vitamins Solution (100X), liquid	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany
[M13]	DMEM-Medium	Dulbecco's Minimal Essential Medium	Gibco, Paisley, Scotland, U.K
[M14]	RPMI Medium für CT26 und B16 ohne pH-Indikator Phenolrot	RPMI -1640-Medium (Roswell Park Memorial Institute)	Biochrome AG, Berlin, Deutschland
[M15]	Epilife-Medium für Keratinozyten	Epilife-Medium	Cascade Biologics, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany Cat: M-EPI-500CA
[M16]	HKGS Kit	Human Keratinocyte Growth Supplement Kit	Cascade Biologics, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany Cat: S-001-5
[M17]	RPMI 1640 für LLC1 mit pH-Indikator Phenolrot	RPMI 1640 mit pH-Indikator Phenolrot	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Germany, PAN P04 16190
[M18]	T75- Zellkulturflaschen	75 cm ² Cell Culture Flask, polystyrene, „surface modified“	Falcon®, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ USA
[M19]	Trypsin-EDTA	Trypsin-EDTA	Gibco, Paisley, Scotland, U.K
[M20]	6-Well-Platten	Multiwell 6 well, tissue culture treated, Falcon®	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA

[M21]	T25- Zellkulturflaschen	76 cm ² Cell Culture Flask, polystyrene, „surface modified“	Falkon®, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ USA
[M22]	PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	Cambrex Bio Science, Verviers, Belgium
[M23]	Trypanblau	SIGMA Trypan Blue C.I. 23850	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany
[M24]	Neubauer-Kammer	Neubauer Improved OptikLabor	LO Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf, Deutschland
[M25]	Elicitin 3	Elicitin Quercinin, bei dessen Aufreinigung ein pH-Wert von 3 herrschte	Prof. Dr. Wolfgang Oßwald, Department für Ökologie, TU-München
[M26]	Elicitin 6	Elicitin Quercinin, bei dessen Aufreinigung ein pH-Wert von 6 herrschte	Prof. Dr. Wolfgang Oßwald, Department für Ökologie, TU-München
[M27]	Elicitin 8	Elicitin Quercinin, bei dessen Aufreinigung ein pH-Wert von 8 herrschte	Prof. Dr. Wolfgang Oßwald, Department für Ökologie, TU-München
[M28]	Rapamycin 10 ng/ml	Rapamune 1mg/ml	Wyeth Pharma GmbH, Münster, Germany
[M29]	MTT-Reagens	3-(4,5-Dimethyl-2thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-Tetrazolium Bromid, Thiazole Blue	Calbiochem® Cat. 475989 Merck Chemicals Limited, Nottingham, UK
[M30]	96-well-Platten	96 well cell culture cluster, nonpyrogenic, Polystyrene, Flat Bottom with Low Evaporation Lid	Corning Inc., NY, USA
[M31]	DMSO	Dimethylsulfoxid, K39145352 837	Merck KGaA, Darmstadt,
[M32]	Kit zur H ₂ O ₂ -Messung	Hydrogen Peroxide Assay Kit	Biovision Cat. Nr. K265-200 CA, USA
[M33]	BCA Proteinbestim-	BC-Assay: Protein Quantitation Kit	Interchim SA, Montluçon, France

mung

[M34]	Nitrozellulosefolie	Nitrozellulosefolie	Schleicher, Schuell Protran BA 85 401 196
[M35]	Ripa Stocklösung	Ripa Stocklösung	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, Steinheim, Germany,
[M36]	Protease Inhibitor	Protease Inhibitor P8340	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, Steinheim, Germany,
[M37]	Phosphatase Inhibitor	Phosphatase Inhibitor P2850	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, Steinheim, Germany,
[M38]	70 % Isopropanol	70 % Isopropanol	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, Steinheim, Germany,
[M39]	Tris MW121, 14	Tris[hydroxymethyl]aminomethan	USB Corporation, Ohio, USA Cat 75825
[M40]	SDS (MW=288,4 g/mol)	Sodiumdodecylsulfat	Merck KGaA, Darmstadt,
[M41]	APS	Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, Steinheim, Germany,
[M42]	TEMED	Tetramethylethylendiamin	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, Steinheim, Germany, T91281
[M43]	Acrylamid-Mix (40%)	Acrylamid-Mix für Westernblot	Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, Steinheim, Germany
[M44]	200 mM Glycin	Glycin	Merck, KGaA, Darmstadt, Germany, Cat 1.04 201
[M45]	Rainbow-Molecular-Weight-Marker	Rainbow-Molecular-Weight-Marker	GE Healthcare UK limited, Buckinghamshire, UK
[M46]	20% Methanol	20% Methanol	Merck, KGaA, Darmstadt, Germany, 1.06009.2500
[M47]	10x TBST	Tris Buffered Saline	Medstor, Toronto, Canada Bio-Rad 170 64 35
[M48]	BSA	Bovine Serum Albumin	Biomol GmbH Hamburg, Germany, Nr 1734
[M49]	Western Blotting Detection Reagent ECL	Detection Reagent 1 + 2 RPN 2106 V1 +2	GE Healthcare UK limited, Buckinghamshire, UK Lot 158

TM

[M50]	Hyperfilm	ECL TM Hyperfilm (25 18*24)	Amersham Biosciences, PRN 2103 K
[M51]	CFSE	CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit (C34554)	Invitrogen, Ltd., Paisley, UK
[M52]	7-AAD	BD Pharmingen™ 7-AAD Staining Solution (Cat 559925)	BD Biosciences, San Jose, CA USA
[M53]	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	Merck KGaA, Darmstadt, Lot 846

8.2 GERÄTE

[G1]	Brutschrank	CO2 Water Jacketed Incubator	Forma Scientific Inc. Ohio, USA
[G2]	Umkehrmikroskop für Zellkultur	Leica Leitz DMIL	Leitz Wetzlar, Deutschland
[G3]	ELISA-Reader	Precision Microplate Reader, Emax	Molecular Devices, CA, USA
[G4]	Schüttler im Brutraum	HS 501 digital	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Germany
[G5]	ELISA-Software	Softmax, 2002, Version 2.31	Molecular Devices, CA, USA
[G6]	Westernblot Kammer (Nassblot)	Mini Transblot ® Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
[G7]	Röntgenfilmkassette	Röntgenfilmkassette Rö 15	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
[G8]	FACS-Gerät	FACSCalibur	BD Biosciences, CA, USA
[G9]	C-Design 3.0 f	C-Design 3.0 f	http://www.ch.tum.de/oCI/EFountain/C-Design/

[G10]	Adobe Photoshop CS 3	Adobe Photoshop CS 3	https://www.adobe.com/mena/products/photoshop/
[G11]	Software am FACS	CellQuest	BD Biosciences, CA, USA
[G12]	Software für FACS-Auswertung	FlowJo	Tree Star Inc. , Oregon, USA

9. LITERATURVERZEICHNIS

- [1]WHO, The WHO's fight against cancer – Strategies that prevent, cure and care. (2007).
- [2]WHO, Global Burden of Disease. (2004) 25.
- [3]K.L. Manchester, Theodor Boveri and the origin of malignant tumours. *Trends Cell Biol* 5 (1995) 384-387.
- [4]P.E.P. Löffler, *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Verlag (2003).
- [5]N. Beerenwinkel, T. Antal, D. Dingli, A. Traulsen, K.W. Kinzler, V.E. Velculescu, B. Vogelstein, M.A. Nowak, Genetic progression and the waiting time to cancer. *PLoS Comput Biol* 3 (2007) e225.
- [6]D. Hanahan, R.A. Weinberg, The hallmarks of cancer. *Cell* 100 (2000) 57-70.
- [7]I. Berenblum, P. Shubik, An experimental study of the initiating state of carcinogenesis, and a re-examination of the somatic cell mutation theory of cancer. *Br J Cancer* 3 (1949) 109-118.
- [8]R.A. Weinberg, How cancer arises. *Sci Am* 275 (1996) 62-70.
- [9]J. Califano, P. van der Riet, W. Westra, H. Nawroz, G. Clayman, S. Piantadosi, R. Corio, D. Lee, B. Greenberg, W. Koch, D. Sidransky, Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 56 (1996) 2488-2492.
- [10]I. Gonzalez-Garcia, R.V. Sole, J. Costa, Metapopulation dynamics and spatial heterogeneity in cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 13085-13089.
- [11]J.L. Tsao, Y. Yatabe, R. Salovaara, H.J. Jarvinen, J.P. Mecklin, L.A. Aaltonen, S. Tavaré, D. Shibata, Genetic reconstruction of individual colorectal tumor histories. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) 1236-1241.
- [12]A. Goel, C.N. Arnold, D. Niedzwiecki, J.M. Carethers, J.M. Dowell, L. Wasserman, C. Compton, R.J. Mayer, M.M. Bertagnolli, C.R. Boland, Frequent inactivation of PTEN by promoter hypermethylation in microsatellite instability-high sporadic colorectal cancers. *Cancer Res* 64 (2004) 3014-3021.
- [13]M.T. Barrett, C.A. Sanchez, L.J. Prevo, D.J. Wong, P.C. Galipeau, T.G. Paulson, P.S. Rabinovitch, B.J. Reid, Evolution of neoplastic cell lineages in Barrett oesophagus. *Nat Genet* 22 (1999) 106-109.
- [14]D.S. Murphy, S.F. Hoare, J.J. Going, E.E. Mallon, W.D. George, S.B. Kaye, R. Brown, D.M. Black, W.N. Keith, Characterization of extensive genetic alterations in ductal carcinoma

in situ by fluorescence in situ hybridization and molecular analysis. *J Natl Cancer Inst* 87 (1995) 1694-1704.

[15]M.A. Castro, T.T. Onsten, R.M. de Almeida, J.C. Moreira, Profiling cytogenetic diversity with entropy-based karyotypic analysis. *J Theor Biol* 234 (2005) 487-495.

[16]P. Duesberg, C. Rausch, D. Rasnick, R. Hehlmann, Genetic instability of cancer cells is proportional to their degree of aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 13692-13697.

[17]H.H. Heng, J.B. Stevens, G. Liu, S.W. Bremer, K.J. Ye, P.V. Reddy, G.S. Wu, Y.A. Wang, M.A. Tainsky, C.J. Ye, Stochastic cancer progression driven by non-clonal chromosome aberrations. *J Cell Physiol* 208 (2006) 461-472.

[18]S. Sharma, T.K. Kelly, P.A. Jones, Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 31 (2010) 27-36.

[19]S. Vinci, S. Gelmini, I. Mancini, F. Malentacchi, M. Pazzagli, C. Beltrami, P. Pinzani, C. Orlando, Genetic and epigenetic factors in regulation of microRNA in colorectal cancers. *Methods* (2012).

[20]B. Barneda-Zahonero, L. Roman-Gonzalez, O. Collazo, T. Mahmoudi, M. Parra, Epigenetic regulation of B lymphocyte differentiation, transdifferentiation, and reprogramming. *Comp Funct Genomics* 2012 (2012) 564381.

[21]M. Shackleton, E. Quintana, E.R. Fearon, S.J. Morrison, Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell* 138 (2009) 822-829.

[22]S.A. Bapat, Evolution of cancer stem cells. *Semin Cancer Biol* 17 (2007) 204-213.

[23]Y. Lazebnik, What are the hallmarks of cancer? *Nat Rev Cancer* 10 (2010) 232-233.

[24]W.O.w. Julia Koehl, Helga Kohn, Erich F. Elstner, Ingrid Heiser, Different responses of two tobacco cultivars and their cell suspension cultures to quercinin, a novel elicitor from *Phytophthora quercina*. *Plant Physiology and Biochemistry* 41 (2003) 261–269 (2003).

[25]J.F. Ingrid Heiser, Maria Gieffing, Julia Koehl, Thomas Jung, Wolfgang Oßwald., Investigations on the action of *Phytophthora quercina*, *P. citricola* and *P. gonapodyides* toxins on tobacco plants. *Plant Physiol. Biochem.*, 37 (1), 73-81 (1999).

[26]E.G. Sergio Pascholati, Wolfgang Oßwald and Julia Koehl, Elicitins.

[27]A. Brummer, Fromm, Schlenzig, Oßwald, Ultrastructural changes and immunocytochemical localization of the elicitor quercinin in *Quercus robur* L. roots infected with *Phytophthora quercina*. *Physiological and molecular plant pathology*.

[28]G. Agrios, *Plant Pathology*, Elsevier, Academic Press Fifth Edition (2005).

- [29]G. Boissy, M. O'Donohue, O. Gaudemer, V. Perez, J.C. Pernollet, S. Brunie, The 2.1 Å structure of an elicitin-ergosterol complex: a recent addition to the Sterol Carrier Protein family. *Protein Sci* 8 (1999) 1191-1199.
- [30]E. Weiler, *Allgemeine und molekulare Botanik*. Thieme Verlag (2008).
- [31]B. Maseko, T.I. Burgess, T.A. Coutinho, M.J. Wingfield, Two new *Phytophthora* species from South African Eucalyptus plantations. *Mycol Res* 111 (2007) 1321-1338.
- [32]S. Mascheretti, P.J. Croucher, A. Vettraino, S. Prospero, M. Garbelotto, Reconstruction of the Sudden Oak Death epidemic in California through microsatellite analysis of the pathogen *Phytophthora ramorum*. *Mol Ecol* 17 (2008) 2755-2768.
- [33]biosecurity@arc.govt.nz, What is *Phytophthora* taxon *Agathis*? Auckland Regional Council (2008).
- [34]M. Ponchet, F. Panabieres, M.L. Milat, V. Mikes, J.L. Montillet, L. Suty, C. Triantaphylides, Y. Tirilly, J.P. Blein, Are elicitins cryptograms in plant-Oomycete communications? *Cell Mol Life Sci* 56 (1999) 1020-1047.
- [35]L.M. Yu, Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 4088-4094.
- [36]M. Sasabe, K. Takeuchi, S. Kamoun, Y. Ichinose, F. Govers, K. Toyoda, T. Shiraishi, T. Yamada, Independent pathways leading to apoptotic cell death, oxidative burst and defense gene expression in response to elicitin in tobacco cell suspension culture. *Eur J Biochem* 267 (2000) 5005-5013.
- [37]A. Lebrun-Garcia, F. Ouaked, A. Chiltz, A. Pugin, Activation of MAPK homologues by elicitors in tobacco cells. *Plant J* 15 (1998) 773-781.
- [38]M.N. Binet, C. Humbert, D. Lecourieux, M. Vantard, A. Pugin, Disruption of microtubular cytoskeleton induced by cryptogein, an elicitor of hypersensitive response in tobacco cells. *Plant Physiol* 125 (2001) 564-572.
- [39]C. Rusterucci, J.L. Montillet, J.P. Agnel, C. Battesti, B. Alonso, A. Knoll, J.J. Bessoule, P. Etienne, L. Suty, J.P. Blein, C. Triantaphylides, Involvement of lipoxygenase-dependent production of fatty acid hydroperoxides in the development of the hypersensitive cell death induced by cryptogein on tobacco leaves. *J Biol Chem* 274 (1999) 36446-36455.
- [40]D. Wendehenne, M.N. Binet, J.P. Blein, P. Ricci, A. Pugin, Evidence for specific, high-affinity binding sites for a proteinaceous elicitor in tobacco plasma membrane. *FEBS Lett* 374 (1995) 203-207.
- [41]H. Kanzaki, H. Saitoh, Y. Takahashi, T. Berberich, A. Ito, S. Kamoun, R. Terauchi, NbLRK1, a lectin-like receptor kinase protein of *Nicotiana benthamiana*, interacts with

Phytophthora infestans INF1 elicitor and mediates INF1-induced cell death. *Planta* 228 (2008) 977-987.

[42]Y.L. Kwang-Yeol Yang, and Shuqun Zhang, Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Plant Biology* (2001).

[43]M.P. Viard, F. Martin, A. Pugin, P. Ricci, J.P. Blein, Protein Phosphorylation Is Induced in Tobacco Cells by the Elicitor Cryptogein. *Plant Physiol* 104 (1994) 1245-1249.

[44]E. Tavernier, D. Wendehenne, J.P. Blein, A. Pugin, Involvement of Free Calcium in Action of Cryptogein, a Proteinaceous Elicitor of Hypersensitive Reaction in Tobacco Cells. *Plant Physiol* 109 (1995) 1025-1031.

[45]A. Pugin, J.M. Frachisse, E. Tavernier, R. Bligny, E. Gout, R. Douce, J. Guern, Early Events Induced by the Elicitor Cryptogein in Tobacco Cells: Involvement of a Plasma Membrane NADPH Oxidase and Activation of Glycolysis and the Pentose Phosphate Pathway. *Plant Cell* 9 (1997) 2077-2091.

[46]S. Bourque, M. Ponchet, M.N. Binet, P. Ricci, A. Pugin, A. Lebrun-Garcia, Comparison of binding properties and early biological effects of elicitors in tobacco cells. *Plant Physiol* 118 (1998) 1317-1326.

[47]M. Sagi, R. Fluhr, Superoxide production by plant homologues of the gp91(phox) NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol* 126 (2001) 1281-1290.

[48]C. Rusterucci, V. Stallaert, M.L. Milat, A. Pugin, P. Ricci, J.P. Blein, Relationship between Active Oxygen Species, Lipid Peroxidation, Necrosis, and Phytoalexin Production Induced by Elicitors in *Nicotiana*. *Plant Physiol* 111 (1996) 885-891.

[49]R.G. Hansford, D. Zorov, Role of mitochondrial calcium transport in the control of substrate oxidation. *Mol Cell Biochem* 184 (1998) 359-369.

[50]K. Schulze-Osthoff, A.C. Bakker, B. Vanhaesebroeck, R. Beyaert, W.A. Jacob, W. Fiers, Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *J Biol Chem* 267 (1992) 5317-5323.

[51]F. Van Herreweghe, J. Mao, F.W. Chaplen, J. Grooten, K. Gevaert, J. Vandekerckhove, K. Vancompernelle, Tumor necrosis factor-induced modulation of glyoxalase I activities through phosphorylation by PKA results in cell death and is accompanied by the formation of a specific methylglyoxal-derived AGE. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 949-954.

[52]S. Dorey, M. Kopp, P. Geoffroy, B. Fritig, S. Kauffmann, Hydrogen peroxide from the oxidative burst is neither necessary nor sufficient for hypersensitive cell death induction, phenylalanine ammonia lyase stimulation, salicylic acid accumulation, or scopoletin consumption in cultured tobacco cells treated with elicitor. *Plant Physiol* 121 (1999) 163-172.

- [53]J.P. Blein, M.L. Milat, P. Ricci, Responses of Cultured Tobacco Cells to Cryptogein, a Proteinaceous Elicitor from *Phytophthora cryptogea*: Possible Plasmalemma Involvement. *Plant Physiol* 95 (1991) 486-491.
- [54]A.S. Petitot, J.P. Blein, A. Pugin, L. Suty, Cloning of two plant cDNAs encoding a beta-type proteasome subunit and a transformer-2-like SR-related protein: early induction of the corresponding genes in tobacco cells treated with cryptogein. *Plant Mol Biol* 35 (1997) 261-269.
- [55]N. Leborgne-Castel, J. Lherminier, C. Der, J. Fromentin, V. Houot, F. Simon-Plas, The plant defense elicitor cryptogein stimulates clathrin-mediated endocytosis correlated with reactive oxygen species production in bright yellow-2 tobacco cells. *Plant Physiol* 146 (2008) 1255-1266.
- [56]S. Vauthrin, V. Mikes, M.L. Milat, M. Ponchet, B. Maume, H. Osman, J.P. Blein, Elicitins trap and transfer sterols from micelles, liposomes and plant plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* 1419 (1999) 335-342.
- [57]D. Takemoto, A.R. Hardham, D.A. Jones, Differences in cell death induction by *Phytophthora* Elicitins are determined by signal components downstream of MAP kinase kinase in different species of *Nicotiana* and cultivars of *Brassica rapa* and *Raphanus sativus*. *Plant Physiol* 138 (2005) 1491-1504.
- [58]H. Osman, S. Vauthrin, V. Mikes, M.L. Milat, F. Panabieres, A. Marais, S. Brunie, B. Maume, M. Ponchet, J.P. Blein, Mediation of elicitin activity on tobacco is assumed by elicitin-sterol complexes. *Mol Biol Cell* 12 (2001) 2825-2834.
- [59]L. Dokladal, M. Oboril, K. Stejskal, Z. Zdrahal, N. Ptackova, R. Chaloupkova, J. Damborsky, T. Kasparovsky, S. Jeandroz, M. Zd'arska, J. Lochman, Physiological and proteomic approaches to evaluate the role of sterol binding in elicitin-induced resistance. *J Exp Bot* 63 (2012) 2203-2215.
- [60]H. Nakagami, A. Pitzschke, H. Hirt, Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends Plant Sci* 10 (2005) 339-346.
- [61]D.K. Morrison, R.J. Davis, Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19 (2003) 91-118.
- [62]H. Pelicano, D. Carney, P. Huang, ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat* 7 (2004) 97-110.
- [63]L. Yu, F. Wan, S. Dutta, S. Welsh, Z. Liu, E. Freundt, E.H. Baehrecke, M. Lenardo, Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) 4952-4957.
- [64]D. Trachootham, Y. Zhou, H. Zhang, Y. Demizu, Z. Chen, H. Pelicano, P.J. Chiao, G. Achanta, R.B. Arlinghaus, J. Liu, P. Huang, Selective killing of oncogenically transformed

cells through a ROS-mediated mechanism by beta-phenylethyl isothiocyanate. *Cancer Cell* 10 (2006) 241-252.

[65]B.J. Altman, J.C. Rathmell, Metabolic stress in autophagy and cell death pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4 (2012).

[66]Y. Chen, E. McMillan-Ward, J. Kong, S.J. Israels, S.B. Gibson, Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. *Cell Death Differ* 15 (2008) 171-182.

[67]B. Levine, J. Yuan, Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest* 115 (2005) 2679-2688.

[68]D. Gozuacik, A. Kimchi, Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* 23 (2004) 2891-2906.

[69]G. Marino, C. Lopez-Otin, Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology. *Cell Mol Life Sci* 61 (2004) 1439-1454.

[70]P. Codogno, A.J. Meijer, Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2 (2005) 1509-1518.

[71]E.H. Baehrecke, Autophagy: dual roles in life and death? *Nat Rev Mol Cell Biol* 6 (2005) 505-510.

[72]G. Loo, Redox-sensitive mechanisms of phytochemical-mediated inhibition of cancer cell proliferation (review). *J Nutr Biochem* 14 (2003) 64-73.

[73]S. Fulda, A.M. Gorman, O. Hori, A. Samali, Cellular stress responses: cell survival and cell death. *Int J Cell Biol* 2010 (2010) 214074.

[74]J. Zhou, P. Giannakakou, Targeting microtubules for cancer chemotherapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 5 (2005) 65-71.

[75]C. Lengauer, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396 (1998) 643-649.

[76]K. Nasmyth, Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosome separation. *Science* 297 (2002) 559-565.

[77]L.H. Hartwell, M.B. Kastan, Cell cycle control and cancer. *Science* 266 (1994) 1821-1828.

[78]A. Jordan, J.A. Hadfield, N.J. Lawrence, A.T. McGown, Tubulin as a target for anticancer drugs: agents which interact with the mitotic spindle. *Med Res Rev* 18 (1998) 259-296.

- [79]M.N. Islam, M.N. Iskander, Microtubulin binding sites as target for developing anticancer agents. *Mini Rev Med Chem* 4 (2004) 1077-1104.
- [80]G.G. Gundersen, T.A. Cook, Microtubules and signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* 11 (1999) 81-94.
- [81]R.K. Srivastava, A.R. Srivastava, S.J. Korsmeyer, M. Nesterova, Y.S. Cho-Chung, D.L. Longo, Involvement of microtubules in the regulation of Bcl2 phosphorylation and apoptosis through cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol* 18 (1998) 3509-3517.
- [82]P.P. Roux, J. Blenis, ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev* 68 (2004) 320-344.
- [83]R. Seger, E.G. Krebs, The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 9 (1995) 726-735.
- [84]G. Cossa, L. Gatti, G. Cassinelli, C. Lanzi, N. Zaffaroni, P. Perego, Modulation of Sensitivity to Antitumor Agents by Targeting the MAPK Survival Pathway. *Curr Pharm Des* (2012).
- [85]V.L. Robinson, J.A. Hickson, D.J. Vander Griend, Z. Dubauskas, C.W. Rinker-Schaeffer, MKK4 and metastasis suppression: a marriage of signal transduction and metastasis research. *Clin Exp Metastasis* 20 (2003) 25-30.
- [86]D. Kultz, Phylogenetic and functional classification of mitogen- and stress-activated protein kinases. *J Mol Evol* 46 (1998) 571-588.
- [87]M. Guba, G.E. Koehl, E. Neppl, A. Doenecke, M. Steinbauer, H.J. Schlitt, K.W. Jauch, E.K. Geissler, Dosing of rapamycin is critical to achieve an optimal antiangiogenic effect against cancer. *Transpl Int* 18 (2005) 89-94.
- [88]F. Fleischmann, J. Koehl, R. Portz, A.B. Beltrame, W. Osswald, Physiological changes of *Fagus sylvatica* seedlings infected with *Phytophthora citricola* and the contribution of its elicitor "citricolin" to pathogenesis. *Plant Biol (Stuttg)* 7 (2005) 650-658.
- [89]M.G. Brattain, J. Strobel-Stevens, D. Fine, M. Webb, A.M. Sarraf, Establishment of mouse colonic carcinoma cell lines with different metastatic properties. *Cancer Res* 40 (1980) 2142-2146.
- [90]M.F. McCarty, A. Takeda, O. Stoeltzing, W. Liu, F. Fan, N. Reinmuth, M. Akagi, C. Bucana, P.F. Mansfield, A. Ryan, L.M. Ellis, ZD6126 inhibits orthotopic growth and peritoneal carcinomatosis in a mouse model of human gastric cancer. *Br J Cancer* 90 (2004) 705-711.
- [91]A. Gaumann, H.J. Schlitt, E.K. Geissler, Immunosuppression and tumor development in organ transplant recipients: the emerging dualistic role of rapamycin. *Transpl Int* 21 (2008) 207-217.

- [92]Y. Liu, D.A. Peterson, H. Kimura, D. Schubert, Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem* 69 (1997) 581-593.
- [93]J. Doly, F. Petek, Polyacrylamide gradient electrophoresis for protein purification on the milligram scale. *J Chromatogr* 137 (1977) 69-81.
- [94]S. Alexander, G.E. Koehl, M. Hirschberg, E.K. Geissler, P. Friedl, Dynamic imaging of cancer growth and invasion: a modified skin-fold chamber model. *Histochem Cell Biol* 130 (2008) 1147-1154.
- [95]T. Zarubin, J. Han, Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 15 (2005) 11-18.
- [96]P. Martin, P. Pognonec, ERK and cell death: cadmium toxicity, sustained ERK activation and cell death. *FEBS J* 277 (2010) 39-46.
- [97]S. Cagnol, J.C. Chambard, ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death--apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J* 277 (2010) 2-21.
- [98]R. Sullivan, C.H. Graham, Chemosensitization of cancer by nitric oxide. *Curr Pharm Des* 14 (2008) 1113-1123.
- [99]J. Slaby, S. Stipek, [Role of free oxygen radicals in the pathogenesis of internal diseases]. *Sb Lek* 91 (1989) 45-51.
- [100]D. Han, E. Williams, E. Cadenas, Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem J* 353 (2001) 411-416.
- [101]I. Szanto, L. Rubbia-Brandt, P. Kiss, K. Steger, B. Banfi, E. Kovari, F. Herrmann, A. Hadengue, K.H. Krause, Expression of NOX1, a superoxide-generating NADPH oxidase, in colon cancer and inflammatory bowel disease. *J Pathol* 207 (2005) 164-176.
- [102]T. Mochizuki, S. Furuta, J. Mitsushita, W.H. Shang, M. Ito, Y. Yokoo, M. Yamaura, S. Ishizone, J. Nakayama, A. Konagai, K. Hirose, K. Kiyosawa, T. Kamata, Inhibition of NADPH oxidase 4 activates apoptosis via the AKT/apoptosis signal-regulating kinase 1 pathway in pancreatic cancer PANC-1 cells. *Oncogene* 25 (2006) 3699-3707.
- [103]S. Matoba, J.G. Kang, W.D. Patino, A. Wragg, M. Boehm, O. Gavrilova, P.J. Hurley, F. Bunz, P.M. Hwang, p53 regulates mitochondrial respiration. *Science* 312 (2006) 1650-1653.
- [104]C. Munoz-Pinedo, N. El Mjiyad, J.E. Ricci, Cancer metabolism: current perspectives and future directions. *Cell Death Dis* 3 (2012) e248.
- [105]T.J. Schulz, R. Thierbach, A. Voigt, G. Drewes, B. Mietzner, P. Steinberg, A.F. Pfeiffer, M. Ristow, Induction of oxidative metabolism by mitochondrial frataxin inhibits cancer growth: Otto Warburg revisited. *J Biol Chem* 281 (2006) 977-981.

- [106]R. Thierbach, T.J. Schulz, F. Isken, A. Voigt, B. Mietzner, G. Drewes, J.C. von Kleist-Retzow, R.J. Wiesner, M.A. Magnuson, H. Puccio, A.F. Pfeiffer, P. Steinberg, M. Ristow, Targeted disruption of hepatic frataxin expression causes impaired mitochondrial function, decreased life span and tumor growth in mice. *Hum Mol Genet* 14 (2005) 3857-3864.
- [107]S. Langbein, M. Zerilli, A. Zur Hausen, W. Staiger, K. Rensch-Boschert, N. Lukan, J. Popa, M.P. Ternullo, A. Steidler, C. Weiss, R. Grobholz, F. Willeke, P. Alken, G. Stassi, P. Schubert, J.F. Coy, Expression of transketolase TKTL1 predicts colon and urothelial cancer patient survival: Warburg effect reinterpreted. *Br J Cancer* 94 (2006) 578-585.
- [108]I. Berenblum, A speculative review; the probable nature of promoting action and its significance in the understanding of the mechanism of carcinogenesis. *Cancer Res* 14 (1954) 471-477.
- [109]W.C. Plaxton, The Organization and Regulation of Plant Glycolysis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47 (1996) 185-214.

10. ABBILDUNGS-VERZEICHNIS

- Abbildung 1 Weltweit erfasste Todesfälle in Millionen nach Ursachen geordnet. Die Anzahl der weltweiten krebsbedingten Tode steigt auch in Zukunft kontinuierlich an. Quelle: WHO, global burden of disease 8
- Abbildung 2 Verteilung der jährlichen Krebsneuerkrankungen nach Regionen geordnet. Quelle: WHO, global burden of disease..... 9
- Abbildung 3 Wirkungsweise von ROS auf Zellen. Durch Schädigung von Zellstrukturen kann über ROS Zelltod vermittelt werden. Verändert nach Fulda, 2010 [69] “Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death” 19
- Abbildung 4 Schematische Darstellung des MAPK-Kaskadenmechanismus in Säugerzellen und Tabak. Es ist denkbar, dass zelltodinduzierende MAPK-Kaskaden auch bei Säugerzellen durch Elicitin getriggert werden können. Verändert nach [40; 55]..... 21
- Abbildung 5 Schematische Darstellung der Wirkungsweise von Rapamycin über eine Aktivierung der p70S6-Kinase. Rapamycin bewirkt über eine Inhibition von mTOR in unterschiedlichen Zellen eine Hemmung von Neoangiogenese und Tumorwachstum, sowie Immunsuppression. Angelehnt an [82]. 22
- Abbildung 6 Beispielhafte Darstellung der Aktivität der P. quercina Elicitine, die hypersensitive Reaktion in Tabakblättern auszulösen. H = Wasserkontrolle; K entspricht Elicitin Q3 A: entspricht Elicitin Q8 (siehe 2.1.2.2) 26

Abbildung 7 Purpur gefärbter, wasserlöslicher, photometrisch messbarer Chelatkomplex des BC-Assays nach Cu^+ Bindung. Anschließend erfolgt die rechnerische Bestimmung der Konzentration.	27
Abbildung 8 Chemische Struktur des MTT im nicht-reduzierten Zustand (gelb). Durch den Kontakt mit mitochondrialen Reduktasen entsteht das blaue, spektrometrisch messbare MTT-Formazan.	32
Abbildung 9 Schematische Darstellung der Funktionsweise eines Westernblots. Durch Primär-AK und primär-AK bindende Sekundär-AK können Antigene spezifisch nachgewiesen werden. Die am Sekundär-AK befindliche Meerrettich-Peroxidase oxidiert Peracid zum luminiszierenden Luminol, welches anschließend für die Belichtung eines Röntgenfilms benutzt wird.	39
Abbildung 10 Chemische Darstellung von CFSE mit den in blau gefärbten Acetatgruppen. Frei modifiziert nach Invitrogen detection technologies, CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit (C34554)	41
Abbildung 11 Fotos der CFSE-gefärbten B-16 nach dem Abtrypsinieren unter dem Durchlichtmikroskop. Die Balkengröße entspricht 20 μm	42
Abbildung 12 Grafische Darstellung der MTTs von Azathioprin und Prograf an TMK-1 (A) und B-16 (B). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden Prograf und Azathioprin jeweils in verschiedenen Diagrammen präsentiert. Dargestellt ist die bei 590nm gemessene optische Dichte zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten ($t = 24\text{h}$, 48h und 72h) $\pm\text{SD}$. Je Versuchsserie wurden 8 Ansätze pro Gruppe gemessen und daraus der Mittelwert ermittelt. Sowohl bei den verwendeten B-16 als auch bei den TMK-1 Zellen, zeigt sich nach 72h eine dosisabhängige Reduktion der optischen Dichte.	46
Abbildung 13 Graphische Darstellung von Experiment 2a: Zellproliferations-Assays für B-16 mit QI und CI. Dargestellt sind die relativen Zellzahlen zur jeweiligen Kontrollgruppe nach 48h. Sowohl in den CI als auch in den QI-wells zeigt sich eine Reduktion der relativen Zellzahl auf unter 20%. Da nur ein Ansatz gezählt wurde, sind keine Fehlerbalken dargestellt.	47
Abbildung 14 Fotografien der B-16 Zellen unter dem Durchlichtmikroskop. Mikroskopisch zeigt sich eine deutlich reduzierte Zellzahl in den QI-wells. Die dargestellte Balkenlänge entspricht 200 μm	48
Abbildung 15 Grafische Darstellung der MTTs von CI und QI an B-16. Dargestellt ist die bei 590nm gemessene optische Dichte zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten ($t = 24\text{h}$, 48h und 72h) $\pm\text{SD}$. Während CI keinen Einfluss auf die Zellaktivität zeigt, waren bei QI in der höchsten Konzentration signifikante bis hochsignifikante Aktivitätssenkungen zu allen Zeitpunkten messbar. Je Versuchsserie wurden 12 Ansätze pro Gruppe gemessen und daraus der Mittelwert ermittelt. * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$	49

Abbildung 16 Graphische Darstellung der Zellproliferations-Assays 2b für CT-26 mit QI und CI. Dargestellt sind die relativen Zellzahlen zur jeweiligen Kontrollgruppe nach 72h. Es zeigte sich eine Reduktion der relativen Zellzahl um 62% in der höchsten QI-Konzentration. Da nur ein Ansatz gezählt wurde, sind keine Fehlerbalken dargestellt.	49
Abbildung 17 Grafische Darstellung des MTT aus Experiment 2b von CI und QI (pH bei Aufreinigung = 6,8) an CT-26. Dargestellt ist die bei 590nm gemessene optische Dichte zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten (t = 24h, 48h und 72h) ±SD. Nach 48h und 72h zeigte sich eine hochsignifikante Aktivitätsminderung bei der höchsten QI Konzentration. Je Versuchsserie wurden 12 Ansätze pro Gruppe gemessen und daraus der Mittelwert ermittelt. * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$	50
Abbildung 18 Grafische Darstellung des Zellproliferationsassays 2b' von CI an CT-26. Dargestellt sind die relativen Zellzahlen prozentual zur jeweiligen Kontrollgruppe zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten (t = 24h, 48h und 72h) ±SD. Nach 72h zeigte sich keine signifikante Zellzahländerung in den CI-wells. Es wurden jeweils Zellzahlbestimmungen pro Gruppe durchgeführt und daraus der Mittelwert ermittelt. * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$	50
Abbildung 19 Grafische Darstellung des MTT von CI und QI an TMK-1 in Experiment 2a. Dargestellt ist die bei 590nm gemessene optische Dichte zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten (t = 24h, 48h und 72h) ±SD. Je Versuchsserie wurden 12 Ansätze pro Gruppe gemessen und daraus der Mittelwert ermittelt. * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$	51
Abbildung 20 Grafische Darstellung des Experimentes 3a: MTT von CI und QI an B-16 (A) und CT-26 (B). Dargestellt ist die bei 590nm gemessene optische Dichte nach 72h ±SD. Es zeigt sich eine Aktivitätsminderung gegenüber der PBS-Kontrolle bei Rapamycin und QI. Je Versuchsserie wurden 12 Ansätze pro Gruppe gemessen und daraus der Mittelwert ermittelt. * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$. Die eingezeichneten Pfeile kennzeichnen einen signifikanten Unterschied zur PBS-Gruppe mit $P < 0,05$	52
Abbildung 21 Graphische Darstellung von Experiment 3b: Zellproliferations-Assays für HUVECs. Aus Gründen mangelnder Verfügbarkeit wurden die Quercinindosen 4, 40 und 400ng/ml verwendet. Dargestellt sind die relativen Zellzahlen zur Kontrollgruppe nach 48h. Es zeigte sich keine signifikante Zellzahlreduktion bei Rapamycin oder QI. Pro Gruppe wurden 3 Ansätze gemessen und daraus der Mittelwert ermittelt. * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$	53
Abbildung 22 Graphische Darstellung des Experimentes 3c: Zellproliferations-Assays für HEK. Aus Gründen mangelnder Verfügbarkeit wurden die QI-Dosen 4, 40 und 400ng/ml verwendet. Dargestellt sind die relativen Zellzahlen zur Kontrollgruppe nach 48h. Pro Gruppe wurden 3 Ansätze gemessen und daraus der Mittelwert ermittelt. Da bei Rapamycin dreimal	

die gleichen Werte gemessen wurden, ist kein Fehlerbalken dargestellt. * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$.	53
Abbildung 23 Grafische Darstellung von Experiment 4, TMK-1 Zellen zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten ($t = 24h, 48h, 72h \pm SD$).	56
Abbildung 24 Grafische Darstellung von Experiment 5, HEK Zellen zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten ($t = 24h, 48h, 72h \pm SD$). * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$.	58
Abbildung 25 Grafische Darstellung von Experiment 6, CT-26 Zellen zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten ($t = 24h, 48h, 72h \pm SD$). * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$.	60
Abbildung 26 Grafische Darstellung von Experiment 7, CT-26 Zellen zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten ($t = 24h, 48h, 72h \pm SD$). * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$.	63
Abbildung 27 Grafische Darstellung von Experiment 8, LLC-1 Zellen zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten ($t = 24h, 48h, 72h \pm SD$).	65
Abbildung 28 Grafische Darstellung von Experiment 9, B-16 Zellen zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten ($t = 24h, 48h, 72h \pm SD$).	67
Abbildung 29 Grafische Darstellung des Vergleichs der BCA-Reagenzien der Laboratorien von Prof. Dr. Geissler und Prof. Dr. Osswald. W steht für die in Prof. Dr. Oßwalds Labor verwendeten Reagenzien, R steht für die in Prof. Dr. Geisslers Labor verwendeten Reagenzien. Ein systematischer Fehler bei der Proteinquantifizierung konnte durch Kreuztestung der verwendeten Reagenzien ausgeschlossen werden.	68
Abbildung 30	70
Abbildung 31 Exemplarische Darstellung der Westernblots mit Antikörpern gegen JNK, p38, P44/42 und p70S6. Während bei den Westernblots von p38 und JNK keine Änderung auftrat, ist bei den Kinasen p 44/42 und p70S6 möglicherweise von einer Regulation nach unten auszugehen.	70
Abbildung 32 Grafische Darstellung von Experiment 12a an B-16 Zellen. Nach 12-stündiger Inkubation in FCS-freiem Medium wurde die Verdünnungsreihe in Medium mit 10% FCS gegeben und in Tripeln zu den Versuchszeitpunkten $t=48h$ und $72h$ ausgezählt. Die 12-stündige Vorbehandlung der Zellen in Diät-Medium führte zu keiner verstärkten Wirkung von Quercinin.	72
Abbildung 33 Grafische Darstellung von Experiment 12b an B-16 Zellen. Nach 12-stündiger Inkubation in FCS-freiem Medium wurde die Verdünnungsreihe abermals in FCS-freiem Medium gegeben. Nach 14 Stunden Inkubation wurde in Tripeln ausgezählt.	73

Abbildung 34 Grafische Darstellung von Experiment 13 zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten ($t = 24h, 48h, 72h \pm SD$) an B-16. Dargestellt sind die absolut gemessenen Zellzahlen der unterschiedlichen Gruppen. Verwendet wurde Q3 mit jeweils unterschiedlichem Gehalt an FCS (0% in A ; 1% in B und 10 % in C). * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$	75
Abbildung 35 Grafische Darstellung der mit unterschiedlichen CFSE-Konzentrationen gefärbten B-16-Zellen vor dem Plattieren. Die mit $2\mu M$ CFSE-gefärbten Zellen haben mit einem Peak bei 10^3 eine sehr gute Fluoreszenz mit guter Differenzierungsmöglichkeit gegenüber den ungefärbten Zellen	76
Abbildung 36 Grafische Darstellung von Experiment 14 (FACS-Analyse). Dargestellt sind die Anteile der apoptotischen Zellen in der erfassten Gesamtzellpopulationen für Rapamycin und Quercininkonzentrationen an B-16-Zellen mit Hilfe des physikalischen Gates, sowie der CFSE- und 7AAD-Gates. Möglicherweise hat Rapamycin einen pro-apoptotischen Effekt. Die Apoptoserate der Quercinin-Proben entsprach in etwa der Kontrollprobe.	79
Abbildung 37 Grafische Darstellung von Experiment 15 (El31) an B-16 Zellen zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten ($t = 72h$ und $96h \pm SD$). * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$	81
Abbildung 38 Grafische Darstellung von Experiment 16 an B-16 Zellen zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten ($t = 24h, 48h, 72h \pm SD$) unter Verwendung von T-25-Zellkulturflaschen. Es wurden 3 mit jeweils unterschiedlichen Methoden aufgereinigte Quercininchargen verwendet (pH-Wert bei Reinigung betrug 3, 6, 8). Dargestellt sind die absolut gemessenen Zellzahlen der unterschiedlichen Gruppen. * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$	82
Abbildung 39 Grafische Darstellung von Experiment 17 an B-16 Zellen zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten ($t = 72h$ und $96h \pm SD$) unter Verwendung von T-25-Zellkulturflaschen. Es wurden 3 mit jeweils unterschiedlichen Methoden aufgereinigte Quercininchargen verwendet (pH-Wert bei Reinigung betrug 3, 6, 8), die Flaschen mit täglich gewechseltem Medium wurden mit „W“ bezeichnet. Der Mediumwechsel scheint keinen Einfluss auf die Elicitinwirkung zu haben. Die Messung des 96h-Wertes konnte aus Gründen mangelnder Elicitin-Verfügbarkeit nicht mit Q8-500 und Q3-50-W erfolgen. Dargestellt sind die absolut gemessenen Zellzahlen der unterschiedlichen Gruppen. * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$	83
Abbildung 40 Grafische Darstellung von Experiment 18, B-16 Zellen zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten ($t = 48$ und $72h \pm SD$) unter Verwendung von T-25-Zellkulturflaschen. Aus Verfügbarkeitsgründen wurden die Experimente ausschließlich mit Q3 (Diagramm A) und Q8 (Diagramm B) durchgeführt und auf 24h-Werte verzichtet. Dargestellt sind die absolut gemessenen Zellzahlen der unterschiedlichen Gruppen für Q3 (A) und Q8 (B). * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$	84

Abbildung 41 Grafische Darstellung von Experiment 19 an B-16 Zellen zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten ($t = 72\text{h}$ und $96\text{h} \pm \text{SD}$) unter Verwendung von 6-Well-Platten. Dargestellt sind die absolut gemessenen Zellzahlen der unterschiedlichen Gruppen. * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$. Durch langsames Wachstum erreichen die Zellen im Rapamycin-Well erst später Konfluenz und schwimmen daher zeitlich verzögert zu den Kontroll- und Quercin-Gruppen ab. 86

Abbildung 42 Grafische Darstellung von Experiment 20 an B-16 Zellen zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten ($t = 72\text{h}$, 96h und $120\text{h} \pm \text{SD}$) unter Verwendung von 6-Well-Platten. Dargestellt sind die absolut gemessenen Zellzahlen der unterschiedlichen Gruppen. * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$ und ist im Vergleich der lebenden Zellen in Bezug zu den lebenden Kontrollzellen erstellt. Das Rapamycin-Well zeigt abermals ein zeitverzögertes Wachstum. Die Zellzahlminderung der vitalen Zellen bei den Quercin-Chargen von 96h nach 120h erklärt sich durch verstärkten Zelltod bzw. Abschwimmen der Zellen nach Erreichen der Konfluenz bei ca. $300 \cdot 10^4$ Zellen..... 87

Abbildung 43 Grafische Darstellung von Experiment 21 an B-16 Zellen zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten ($t = 72\text{h}$, 96h und $120\text{h} \pm \text{SD}$) unter Verwendung von T-25-Zellkulturflaschen. Dargestellt sind die absolut gemessenen Zellzahlen der unterschiedlichen Gruppen. Die gestrichelten Linien zeigen den Verlauf der gezählten toten Zellen der Gruppen. * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$ und ist im Vergleich der lebenden Zellen in Bezug zu den lebenden Kontrollzellen erstellt. . 87

Abbildung 44 Grafische Darstellung von Experiment 22 an B-16 Zellen zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten ($t = 72\text{h}$, 96h und $120\text{h} \pm \text{SD}$). Dargestellt sind die Zellzahlen der vitalen und toten Zellen der unterschiedlichen Gruppen. Die gestrichelten Linien zeigen den Verlauf der gezählten toten Zellen der Gruppen. * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$ und ist im Vergleich der lebenden Zellen in Bezug zu den lebenden Kontrollzellen erstellt. 88

Abbildung 45 Grafische Darstellung von Experiment 23 an B-16 Zellen zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten ($t = 24$ und $72\text{h} \pm \text{SD}$). A zeigt die Zellzahlen bei einer plattierten Zellzahl von $10\,000$, B zeigt Zellzahlen bei einer plattierten Zellzahl von $500\,000$. * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$ 90

Abbildung 46 Grafische Darstellung von Experiment 24 an B-16 Zellen mit nichtlyophilisiertem Elicitin zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten ($t = 24\text{h}$, 48h und $72\text{h} \pm \text{SD}$). Dargestellt sind die absolut gemessenen Zellzahlen der unterschiedlichen Gruppen. Die * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$. Der Ausreißer bei Q50 nach 72h ist wahrscheinlich durch einen technischen Fehler bedingt, ansonsten konnten auch durch die Verwendung von nicht-lyophilisiertem Quercinin keine reproduzierbaren Zellzahlensenkungen erreicht werden..... 91

Abbildung 47 Grafische Darstellung von Experiment 24⁺ mit B-16. Gezeigt ist die gemessene optische Dichte bei 590nm zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten (t = 24h, 48h, 72h \pm SD). * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe mit $P < 0,05$; ** $P \leq 0,001$ 92

Abbildung 48 Darstellung der Abschwimmhypothese. Die Zellen schwimmen nach Erreichen der Konfluenz ab. Quercinin erreicht schneller Konfluenz als die Kontrolle und Rapamycin und schwimmt deshalb schneller ab. In den ersten Experimenten könnte die Zellzahl am Schnittpunkt zwischen der roten und der blauen Kurve bestimmt worden sein: Quercinin ist wieder erniedrigt (Zellen schwimmen gerade ab), Rapamycin ist noch niedrig (wegen verlangsamten Wachstums) und die Kontrolle wächst in normaler Geschwindigkeit..... 109

Abbildung 49 Isoelektrische Fokussierung einer inaktiven *P. quercina* Elicitinfraktion (Elicitingewinnung siehe 2.1.2.3). Während bei Elicitin des aktiven Isolates unterschiedliche Banden in der isoelektrischen Fokussierung sichtbar waren, zeigte sich in der Analyse des später verwendeten Elicitins nur eine einzige Bande (Isoelektrischer Punkt bei 7.7). 110

11. TABELLEN-VERZEICHNIS

Tabelle 1 Übersicht über Zelllinie, Abkürzung, Dignität und Ursprung der in den Experimenten verwendeten Zellen. 28

Tabelle 2 Übersicht über die verwendeten Western-Blot-Antikörper und deren Bezugsort ... 35

12. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

7AAD	7-Aminoactinomycin
AK	Antikörper
B-16	B16-F10-Melanomzellen
BCA	bicinchoninic acid
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CI-5	Elicitin Citricolin in der Konzentration von 5ng/ml (aktives Isolat)
CI-50	Elicitin Citricolin in der Konzentration von 50ng/ml (aktives Isolat)
CI-500	Elicitin Citricolin in der Konzentration von 500ng/ml (aktives Isolat)
Colon-CA	Karzinom des Kolon
CT-26	CT26-Colon-Adenokarzinom

DMEM	Dulbecco's Minimal Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Elektrochemolumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinasen
FACS	engl. fluorescence activated cell sorting
FAP	Erblicher Darmkrebs
FCS	fetales Kälberserum
HEK	Humane Keratinozyten
HR	hypersensitive Reaktion
HRP	Meerrettichperoxidase
HUVEC	engl. Human umbilical vein endothelial cells
IL-2	Interleukin 2
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LLC-1	LLC-1-Lewis Lung Carcinoma
LLR-Rezeptor	engl. Leucin-rich-repeat-rezeptorkinase
MAP-Kinase	engl. mitogen-activated protein
mTOR	engl. mammalian Target of rapamycin
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dyphenyltetrazolium bromid
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAL	Phenylalanin ammonium lyase
PAMP	engl. Pathogen-associated molecular patterns
PBS	phosphat gepufferte Salzlösung
Q3-5	Elicitin Quercinin, bei dessen Aufreinigung ein pH-Wert von 3 herrschte in der Konzentration von 5ng/ml (gelagertes Isolat)
Q3-50	Elicitin Quercinin, bei dessen Aufreinigung ein pH-Wert von 3 herrschte in der Konzentration von 50ng/ml (gelagertes Isolat)
Q3-500	Elicitin Quercinin, bei dessen Aufreinigung ein pH-Wert von 3 herrschte in der Konzentration von 500ng/ml (gelagertes Isolat)
Q6-5	Elicitin Quercinin, bei dessen Aufreinigung ein pH-Wert von 6 herrschte

	in der Konzentration von 5ng/ml (gelagertes Isolat)
Q6-50	Elicitin Quercinin, bei dessen Aufreinigung ein pH-Wert von 6 herrschte in der Konzentration von 50ng/ml (gelagertes Isolat)
Q6-500	Elicitin Quercinin, bei dessen Aufreinigung ein pH-Wert von 6 herrschte in der Konzentration von 500ng/ml (gelagertes Isolat)
Q8-5	Elicitin Quercinin, bei dessen Aufreinigung ein pH-Wert von 8 herrschte in der Konzentration von 5ng/ml (gelagertes Isolat)
Q8-50	Elicitin Quercinin, bei dessen Aufreinigung ein pH-Wert von 8 herrschte in der Konzentration von 50ng/ml (gelagertes Isolat)
Q8-500	Elicitin Quercinin, bei dessen Aufreinigung ein pH-Wert von 8 herrschte in der Konzentration von 500ng/ml (gelagertes Isolat)
QA	Ausschließlich über einen Anionenaustauscher gewonnenes Quercinin
QA+K	Über Anionenaustauscher und Kationenaustauscher gewonnenes Quercinin
QI-5	Elicitin Quercinin, bei dessen Aufreinigung ein pH-Wert von 6 herrschte in der Konzentration von 5ng/ml (aktives Isolat)
QI-50	Elicitin Quercinin, bei dessen Aufreinigung ein pH-Wert von 6 herrschte in der Konzentration von 50ng/ml (aktives Isolat)
QI-500	Elicitin Quercinin, bei dessen Aufreinigung ein pH-Wert von 6 herrschte in der Konzentration von 500ng/ml (aktives Isolat)
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPMI	Zellkulturmedium nach Roswell Park Memorial Institute hergestellt
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SIPK	engl. Salicylic-acid-induced-protein kinase
SOD	Plötzlicher Eichentod
TBST	Tris-Buffered Saline Tween
TMK-1	TMK-1-Magenkarzinomzellen
TU	Technische Universität
UV	Ultraviolett
VEGF	engl. Vascular endothelial growth factor
WIPK	engl. wounding-induced protein kinase